

# **Biologické vlastnosti hydrogelových filmů pro hojení ran**

Bc. Antonín Malík

---

Diplomová práce  
2021

 **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně**  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Antonín Malík**  
Osobní číslo: **T19766**  
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**  
Studijní obor: **Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Kombinovaná**  
Téma práce: **Biologické vlastnosti hydrogelových filmů pro hojení ran**

### Zásady pro vypracování

#### I. Teoretická část

1. Hojení ran je proces, při kterém dochází k obnově porušeného tkaniva. Při tomto procesu je velké riziko vzniku infekce a zánětu, co může vést k stagnaci hojení.
2. Věnujte se popisu procesu hojení ran a možným komplikacím.

#### II. Praktická část

1. Připravte hydrogely napuštěné bioaktivními látkami, které budou dále podrobeny biologickým testům v kontextu hojení ran, především scratch assay.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] DIPIETRO, L. A., BURNS, A. L. (Eds.). (2003). Wound healing: methods and protocols (Vol. 78). Springer Science & Business Media.
- [2] MIDDLETON, J. E. (2011). Wound Healing: Process, Phases, and Promoting. Nova Science Publishers.
- [3] FFRESHNEY, R. I. (2015). Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. John Wiley & Sons.
- [4] IKADA, Y. (2011). Tissue engineering: fundamentals and applications. Elsevier.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Zdenka Capáková, Ph.D.**  
Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Marián Lehotský, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2021

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užit své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne: 14.5.2021

Jméno a příjmení studenta: Bc. Antonín Malík

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá problematikou hojení ran a přípravou hydrogelů určených pro krytí ran. Teoretická část se zabývá stavbou kůže, procesem hojení, možnými komplikacemi během hojení a metodami léčby ran. Praktická část je zaměřena na přípravu hydrogelů na bázi polyvinylalkoholu (PVA) zesíťovaného pomocí 2,3-dialdehydcelulózy (DAC) o různé koncentraci, stanovení jejich cytotoxicity na buněčnou linii myších fibroblastů NIH/3T3 a na sledování *in vitro* buněčné migrace metodou scratch assay po aplikaci hydrogelů narušených bioaktivními látkami. Výsledky naznačují vhodnost připravených materiálů pro topické aplikace.

Klíčová slova: hydrogel, kůže, hojení ran, cytotoxicita, buněčná migrace

## **ABSTRACT**

This diploma thesis focuses on the issues of wound healing and the preparation of hydrogels utilized for wound dressing. The theoretical part deals with the structure of the skin, the healing process, possible complications during healing and methods of wound healing. The practical part is focused on the preparation of hydrogels based on polyvinyl alcohol (PVA) crosslinked with 2,3-dialdehyde cellulose (DAC), determination of their cytotoxicity on the cell line of mouse fibroblasts NIH / 3T3 and on monitoring cell migration *in vitro* by scratch assay after application of hydrogels loaded with bioactive substances. The obtained results suggest the suitability of prepared materials for topical applications.

Keywords: hydrogel, skin, wound healing, cytotoxicity, cell migration

Rád bych tímto poděkoval Ing. Zdence Capákové, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení, ochotu, pomoc a vynaložený čas, který mi věnovala při vzniku této práce. Dále bych také chtěl poděkovat Ing. Simoně Káčerové za ochotu a pomoc v laboratoři. Zejména však mé poděkování patří všem mým blízkým za celkovou podporu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>10</b>
<b>1 KŮŽE.....</b>	<b>11</b>
1.1 STAVBA KŮŽE.....	11
1.1.1 Pokožka - Epidermis .....	11
1.1.2 Škára – Dermis .....	15
1.1.3 Podkoží - Hypodermis.....	16
1.2 BARIÉROVÁ FUNKCE KŮŽE .....	16
1.2.1 Komponenty stratum corneum.....	17
1.2.2 Těsná spojení (tight junctions).....	17
1.2.3 Filaggrin .....	18
<b>2 TYPY RAN .....</b>	<b>19</b>
2.1 DĚLENÍ DLE PRŮBĚHU .....	19
2.2 DĚLENÍ DLE KONTAMINACE.....	19
2.2.1 Čisté rány .....	19
2.2.2 Kontaminované rány .....	20
2.2.3 Infikované rány .....	20
2.2.4 Kolonizované rány .....	20
2.3 DĚLENÍ DLE ROZSAHU .....	20
2.3.1 Zavřené rány.....	20
2.3.2 Povrchové rány.....	21
2.3.3 Hluboké rány .....	21
2.4 DĚLENÍ DLE ZPŮSOBU HOJENÍ.....	23
2.4.1 Primární hojení.....	23
2.4.2 Opožděné primární hojení.....	24
2.4.3 Sekundární hojení.....	24
<b>3 FÁZE HOJENÍ.....</b>	<b>25</b>
3.1 RŮSTOVÉ FAKTORY .....	25
3.2 FÁZE HEMOSTATICKÁ.....	25
3.3 ZÁNĚTLIVÁ FÁZE.....	26
3.4 PROLIFERATIVNÍ FÁZE .....	28
3.5 EPITELIZAČNÍ (DIFERENCIAČNÍ) FÁZE.....	29
<b>4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ HOJENÍ RAN .....</b>	<b>30</b>
4.1 LOKÁLNÍ FAKTORY.....	30
4.1.1 Velikost, typ a umístění rány .....	30
4.1.2 Stav tkáně a cizí tělesa v ráně .....	30
4.1.3 Infekce.....	31
4.1.4 Nedostatečné zásobení rány krví.....	31
4.2 SYSTÉMOVÉ FAKTORY .....	32
4.2.1 Diabetes mellitus (DM).....	32
4.2.2 Věk a stav imunitního systému .....	32
4.2.3 Životní styl a strava .....	33
4.2.4 Pohyb a duševní stav .....	34

<b>5</b>	<b>KOMPLIKACE PŘI HOJENÍ RAN</b> .....	<b>35</b>
5.1	DEHISCENCE RÁNY .....	35
5.2	KRVÁCENÍ RÁNY A PORUCHY SRÁŽLIVOSTI KRVE.....	35
5.3	HYPERTROFNÍ JIZVA .....	36
5.4	NEKROTICKÁ RÁNA A GANGRÉNA .....	36
5.5	ZÁNĚT V OKOLÍ RÁNY .....	37
5.6	REAKCE NA CIZORODÝ MATERIÁL .....	37
5.7	KONTRAKTURY .....	37
<b>6</b>	<b>METODY LÉČBY</b> .....	<b>38</b>
6.1	DEBRIDEMENT.....	38
6.2	GÁZOVÉ KRYTÍ.....	39
6.3	VLHKÁ TERAPIE .....	39
6.4	KOMPRESNÍ TERAPIE .....	40
6.5	PODTLAKOVÁ TERAPIE .....	41
6.6	DALŠÍ METODY KRYTÍ RAN.....	41
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>METODA PŘÍPRAVY HYDROGELŮ PVA/DAC A KULTIVACE BUNĚČNÉ LINIE</b> .....	<b>44</b>
8.1	POUŽITÉ MATERIÁLY .....	44
8.2	PŘÍPRAVA PVA/DAC HYDROGELŮ .....	44
8.3	NAPUŠTĚNÍ A UVOLŇOVÁNÍ HYDROGELŮ .....	46
8.4	KULTIVACE BUNĚČNÉ LINIE .....	46
<b>9</b>	<b>TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ HYDROGELŮ</b> .....	<b>47</b>
9.1	STANOVENÍ CYTOTOXICITY EXTRAKTEM.....	47
9.2	STANOVENÍ CYTOTOXICITY PŘÍMÝM KONTAKTEM .....	48
9.3	MTT TEST .....	48
9.4	SCRATCH ASSAY.....	49
<b>10</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>51</b>
10.1	TEST CYTOTOXICITY .....	51
10.2	VÝSLEDKY SCRATCH ASSAY .....	54
	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>56</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>58</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>69</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>70</b>
	<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>71</b>



## ÚVOD

Kůže představuje základní pilíř v obraně lidského organismu před vnějšími vlivy a jakékoli porušení její celistvosti představuje potenciální riziko. Je proto nezbytné, aby se jakékoli rány co nejlépe a nejrychleji zahojily. Tomuto procesu předchází celá řada přesně řízených fyziologických pochodů, jejichž cílem je ránu zbavit jakýchkoli nečistot, obnovit nejdůležitější prvky poničené tkáně, ránu zacelit a zpevnit. Výsledek takového hojení poté závisí na celé řadě okolností, ať už jsou to vnitřní (věk a celkový zdravotní stav pacienta) nebo vnější faktory (například mechanické vlivy nebo lokální infekce), či případné potíže, které mohou průběh zahojení rány zkomplikovat, léčení značně prodloužit i způsobit neuspokojivé estetické výsledky zhojené rány.

Vývoj v oblasti materiálového inženýrství přináší v současné době celou řadu biokompatibilních materiálů, jejichž aplikace zajistí optimální prostředí pro hojení ran. Mezi těmito materiály se stále více dostávají do popředí příčně zesíťované polymerní řetězce známé také jako hydrogely, vyznačující se značnou hydrofilitou a obrovskou kapacitou schopnou pojmout mnohonásobně vyšší množství vody, než je jejich hmotnost. Vzhledem k jejich vlastnostem jsou schopné simulovat přirozenou tkáň, nízká cytotoxicita a schopnost absorbovat a uvolňovat léčivé látky je předurčuje pro použití mimo jiné jako ideální krycí médium při hojení ran.

Hydrogely, na které je zaměřena tato diplomová práce, byly připraveny zesíťováním polyvinylalkoholu a 2,3-dialdehyd celulózy. Mezi zásadní kritéria předurčující vhodnost hydrogelů pro kosmetické a biomedicínské účely je jejich biokompatibilita. Proto byly podrobeny zkouškám na cytotoxicitu a také byl stanoven jejich účinek na schopnost hojení ran v kombinaci s bioaktivními látkami.

## I. TEORETICKÁ ČÁST

# 1 KŮŽE

Kůže je velice důležitým orgánem těla v celé živočišné říši, neboť představuje první ochrannou vrstvu mezi samotným organismem a vnějším prostředím, ve kterém se nachází. U průměrného dospělého člověka dosahuje plochy přibližně 1,73 m<sup>2</sup> a podílí se na hmotnosti těla 8 až 16 procenty. [1] Kromě toho, že slouží jako ochranná bariéra, patří mezi její základní funkce dále také udržování homeostázy, neboť zabraňuje dehydrataci organismu regulací transepidermální ztráty vody (TEWL). Kůže je dále důležitá z hlediska vylučování, termoregulace, participace na imunitních procesech, vnímání okolí a tvorba vitamínu D<sub>3</sub> za účasti ultrafialového záření. V neposlední řadě plní také sociální funkci, neboť právě kůže je místem procesů rozhodujících o tom, jak o sobě navzájem přemýšlíme, cítíme a komunikujeme. [2]

## 1.1 Stavba kůže

Z histologického hlediska dělíme kůži na 3 základní vrstvy. Ve směru z vnějšku dovnitř jsou to pokožka neboli epidermis složená z 6 vrstev epiteliálních postupně se odlupujících neboli deskvamujících buněk. Střední vrstvu, nazývanou škára (dermis), tvoří vazivová tkáň prostoupená cévami, kožními adnexy a receptory. Poslední vrstvou je podkoží (subcutis), které obsahuje zejména řídké a tukové vazivo a pomáhá fixovat kůži k tkáním hlubších vrstev. Tloušťka kůže se liší v závislosti na části těla. Například kůže pokrývající lebku má sílu přibližně 1,5 mm, zatímco kůže na zádech je silná až 5 mm. [3]

### 1.1.1 Pokožka - Epidermis

Pokožka plní převážně bariérovou funkci, je ektodermálního původu a sestává se z vícevrstevného dlaždicového epitelu, který směrem k povrchu rohovatí. Tyto epitelové buňky potřebují podle posledních studií přibližně 40 až 56 dní k tomu, dostat se ze zárodečné bazální vrstvy až k povrchu pokožky. U neinfekčního onemocnění zvaného psoriáza neboli lupénka, je tato doba zkrácena na 6 až 8 dní a dochází při tom k značnému odlupování odumřelé pokožky. [4] Vzhledem k absenci vaskularizace je tato vrstva sycena kyslíkem společně s dalšími živinami difúzí ze škáry. Celková tloušťka pokožky je 0,05 – 0,1 mm a dle výšky zrohovatělé vrstvy (stratum corneum) ji dělíme na tenký a tlustý typ epidermis. Většinu těla pokrývá tenký typ, který obsahuje potní, mazové či aromatické žlázy, chlupy, vlasy a jiná adnexa. Na fyzicky nejvíce namáhaných částech kůže, tedy na

dlaních a ploskách chodidel včetně navazujících ploch prstů obou končetin se nachází tlustý typ. Tento typ postrádá ochlupení a aromatické i mazové žlázy.

Hlavním a nejvíce zastoupeným typem buněk v pokožce jsou keratinocyty. Dále se zde nachází melanocyty, Langerhansovy a Merkelovy buňky.

### **Keratinocyty**

Keratinocyty jsou nejvíce zastoupeným buněčným typem v celé pokožce, jsou cylindrického tvaru, který se směrem k povrchu epidermis zplošťuje a jsou odpovědné za funkci kůže jako ochranné bariéry. Proliferace těchto buněk probíhá v bazální vrstvě na rozhraní mezi pokožkou a škárkou, kde vznikají z kmenových buněk. Keratinocyty se nad touto vrstvou již dále nedělí, a zatímco postupují směrem k horním vrstvám pokožky, dochází u nich k celkové přeměně vedoucí až k jejich odumření a zrohovatění. Tyto buňky jsou poté odloučeny od pokožky v podobě šupin. Vzhledem k tomu, že se jedná o kontinuální proces, je zapotřebí, aby docházelo k produkci keratinocytů po celou dobu života. [5]

### **Melanocyty**

Tyto buňky jsou přítomné v mnoha tkáních a podílí se na pigmentaci povrchových struktur. [6] V pokožce se nacházejí roztroušené při bazální membráně, ke které jsou přichyceny pomocí hemidesmozomů, avšak samy mezi sebou spojeny nejsou. Hlavní funkcí těchto buněk je tvorba melaninů, v pokožce převážně eumelaninu. Prvním krokem syntézy melaninu je přeměna aminokyseliny L-tyrosinu pomocí tyrosinázy na DOPA (3,4-dihydroxyfenylalanin), který se dále upravuje a polymeruje na různé druhy melaninu. Melanin se poté akumuluje do přibližně 1 μm velkých granul označovaných jako melanosomy. Ty jsou poté pomocí cytoskeletálních kinesinů transportovány do konců cytoplasmatických invaginací melanocytů, které prostupují do vyšších vrstev epidermis a končí v blízkosti keratinocytů. Tyto konce cytoplasmatické membrány jsou poté pomocí fagocytózy přeneseny do keratinocytů do blízkosti jádra. [3] Zde se melanosomy kumulují a tvoří ochrannou čepici a chrání tak DNA jádra před účinky záření UVA a převážně mnohem pronikavějšího krátkovlnného UVB. Mimo to se melaninu přisuzuje také funkce anti-oxidantu a lapače volných radikálů. [7]

### **Langerhansovy buňky**

Langerhansovy buňky jsou mesenchymálního původu a vyvíjí se v kostní dřeni. Jsou to dendritické, v celé pokožce řídké rozptýlené buňky, převážně však ve vrstvě stratum spi-

nosum. Jejich dlouhé výběžky zachycují antigeny mezi jednotlivými keratinocyty, který poté dále zpracovávají a nakonec prezentují T-lymfocytům. Dále jsou schopné mimo fagocytózy také uvolnění cytokinů, jako je interleukin-1, pro podporu chemotaxe a aktivace lymfocytu. [8] Langerhansovy buňky jsou tedy odpovědné za ochranu před vnikem patologických mikroorganismů do kůže a považují se za nejperifernější část imunitního systému.

### **Merkelovy buňky**

Jedná se o nízkoprahové mechanoreceptory pocházející z epidermální linie, které jsou důležité pro správné neurální kódování jemných dotyků. [9] Nejvíce jsou zastoupené na konečcích prstů a zevním genitálu. Nacházejí se při bazální membráně epidermis, kde jsou připojeny pomocí desmozomů k okolním keratinocytům. Od těch se liší převážně denzními granuly původem z Golgiho aparátu, která jsou umístěna při bazolaterální stěně, kde jsou buňky v synaptickém kontaktu s terminálními disky nemyelinizovaných vláken neuronů, která prostupují skrze bazální membránu. Jemný dotyk kůže způsobí uvolnění neurotransmiterů a výsledkem je dotykový vjem v této oblasti. [3] Jedinečný princip mechanismu přenosu taktálních informací Merkelových buněk inspiroval vědce k vytvoření dotykového senzoru na bázi organického synaptického transistoru, který napodobuje synaptická spojení a jeho využití se předpokládá v umělé inteligenci a u autonomních systémů, které vyžadují neprodlené rozhodovací procesy a vysoce energeticky efektivní provoz. [10]

Z histologického hlediska dělíme stavbu pokožky člověka na 6 vrstev a to primárně na základě stupně diferenciací keratinocytů: [1]

### **Stratum basale**

Tato vrstva je tvořena jednou řadou mitoticky aktivních kubických či cylindrických keratinocytů, které nasedají přímo na bazální membránu. Keratinocyty jsou mezi sebou pevně vázány pomocí desmozomů. Tento typ mezibuněčných spojů se nachází v silně namáhaných tkáních jako je myokard, močový měchýř nebo kůže a je napojen na vnitrobuněčnou cytoskeletální síť intermediálních keratinových filament (takzvaná tonofilamenta) pomocí proteinů desmoplakinů a plakoglobinů. Samotnou soudržnost mezi jednotlivými desmozomy zajišťují cadheriny. [11] K bazální membráně jsou keratinocyty vázány multiproteinovými komplexy označovanými jako hemidesmozomy, za účasti takzvaných integrinů. Právě tato vazba hraje velmi důležitou roli v soudržnosti kůže a v udržování stabilního vnitřního prostředí epidermis. Její narušení jakéhokoli původu vede k mnoha kožním one-

mocněním, které jsou doprovázeny puchýři a souborně se označují jako epidermolysis bullosa. [12]

### **Stratum spinosum**

Je nejsilnější vrstvou pokožky a vyznačuje se přítomností polyedrických keratinocytů s centrálně uloženým jádrem. V těchto buňkách jsou tonofilamenta velice nápadná a jejich úpony končí ve výběžcích buněčné membrány, kde se jednotlivé buňky mezi sebou spojují desmozomy. Během přípravy histologických preparátů pro světelnou mikroskopii dochází ke smrštění buněk, čímž tyto výběžky značně vyniknou a jsou pozorovány jako ostny neboli spiny. Odtud je poté odvozen název této vrstvy. [1]

### **Stratum granulosum**

Keratinocyty v této vrstvě jsou zploštělé, procházejí terminálním vývojovým stádiem a ve své cytoplazmě vykazují značné množství silně bazofilních tělísek, které se označují jako keratohyalinní granula a společně s dalšími proteinovými prvky tonofilament vytváří v cytoplazmě velké struktury. Zároveň se do okolí buněk dostávají pomocí exocytózy granula odvozená od Golgiho aparátu, která vytváří ve vyšších vrstvách epidermis kolem buněk vrstvu lipidového charakteru, která se z velké části podílí na bariérové funkci kůže a zabraňuje ztrátám vody. Tato vrstva tak například také hrála klíčovou roli u pravěkých živočichů, kdy jim umožnila život na souši. [13]

### **Stratum lucidum**

Tato tenká průsvitná vrstva se nachází pouze u tlustého typu kůže. Je tvořena dvěma řadami zploštělých odumřelých keratinocytů, které díky z keratohyalinu se postupně tvořícího eleidinu jsou silně eozinofilní. Jádra ani buněčné orgány se v těchto buňkách již nenachází.

### **Stratum corneum**

Zploštělé buňky v této vrstvě, označované jako korneocyty, jsou vyplněné vlákny keratinu a jsou seřazeny až do 20 vrstev a určují tak tenký nebo tlustý typ kůže. Tato vrstva se největší částí podílí na kožní bariéře, neboť poskytuje ochranu proti fyzikálním, chemickým a mechanickým vlivům a spolu s mazem zabraňuje ztrátám vody, minerálů a bílkovin, zamezuje smáčivosti pokožky a brání průniku cizorodých mikroorganismů. [1]

### **Stratum disjunctum**

Jedná se o poslední vrstvu, ne vždy samostatně uváděnou v literatuře, ve které je soudržnost keratinocytů narušena rozpadem desmozomů a jednotlivé buňky se tak neustále odlupují ve formě šupin, které se označují jako korneocyty. Jejich obsah tvoří převážně keratinová vlákna spojená za pomoci proteinu filaggrinu. [1]

### **1.1.2 Škára – Dermis**

Škára je střední silná vrstva kůže mezodermálního původu navazující na pokožku, od níž je oddělená bazální membránou. Zajišťuje především výživu epidermis a mechanickou pevnost kůže. Její tloušťka se liší dle místa na těle, kdy na víčkách dosahuje síly přibližně 0,6 mm a na zádech nebo chodidlech to mohou být až 4 mm. Je tvořena pojivovou tkání, četnými nervovými a vaskulárními pleteněmi. Tyto vaskulární plexy, které se nejvíce nacházejí u člověka v holé kůži dlaní a plosek nohou, mají mezi sebou mnohá arterio-venózní anastomózy (AVA), která propojují drobné tepny s drobnými žilami a zajišťují lepší termoregulaci díky změnám průměru lumen cév. Tyto změny jsou ovládané z centra regulace tělesné teploty v hypothalamu. Veškeré AVA jsou simultánně uzavírány při dolní hranici a naopak otevírány při horní hranici termoneutralní zóny, která je u nahého člověka dána rozpětím přibližně 26 °C – 36 °C. [14] Dále škára obsahuje vlasové folikuly, potní a mazové žlázy, lymfatické cévy a velké množství mechanoreceptorů a termoreceptorů. Její vnější povrch je zvrásněný a je tvořený výstupky (dermal papillae), které zapadají do protilehlých zářezů epidermis, což zvyšuje pevnost dermo-epidermálního spojení. [3] Mezi početné buněčné typy nacházející se v dermis patří fibroblasty, mastocyty, makrofágy anebo například adipocyty.

### **Fibroblasty**

Fibroblasty jsou buňky mesodermálního původu vřetenovitého tvaru s podlouhlým oválným jádrem hojně se vyskytující v celé dermis. Jejich funkcí je syntéza kolagenu a komponent mezibuněčné hmoty (ECM) a zapojují se do výstavby a oprav strukturálních součástí kůže. Hrají také hlavní roli v hojení ran, kam se dostávají za pomoci růstových faktorů a kde se mění na myofibroblasty, které zapříčiní smrštění rány. Do svého okolí poté produkují ECM obohacenou o fibronektin a hyaluronan [15]

Ve fibroblastech probíhá první část syntézy kolagenu. Nejdříve na polyribosomech membrán granulárního endoplasmatického retikula dochází k syntéze trojšroubovice prokolage-

nu. Ten je následně biochemicky upraven a vzniká tropokolagen, který je vyloučen do extracelulárního prostoru, kde proběhne druhá část tvorby kolagenu. Při ní vzniká polymerací molekul tropokolagenu finální kolagenní vlákno. [16]

Škára se dělí na dvě vrstvy:

### **Stratum papillare**

Název je odvozen od dermálních papil na hranici mezi škárkou a pokožkou. Tyto mnohdy velmi vysoké útvary se projevují jako otisky prstů na povrchu kůže dlaní a chodidel. Cévní pleteně této vrstvy poskytují výživu pokožky, zajišťují výměnu odpadních látek a kyslíku. Stratum papillare je tvořeno převážně řídkým vazivem s majoritním podílem kolagenu typu I a III, fibroblasty, leukocyty a dendritickými a žírnými buňkami. Z mechanického hlediska poskytuje kůži tato vrstva díky kolagenu převážně pevnost. [8]

### **Stratum reticulare**

Tato hluboká vrstva škály je silnější než předchozí vrstva, obsahuje méně roztroušených buněk, ale zato více vláken a to především retikulárních, kolagenu typu I a také značné množství elastinu, který dodává kůži její pružnost. [8]

#### **1.1.3 Podkoží - Hypodermis**

Tato vrstva spojuje škáru s hlubšími strukturami, jako jsou svalové povázky, okostice nebo vazivo pokrývající klouby. Je tvořena převážně volnou pojivovou tkání, díky které se může po těchto strukturách kůže volně klouzat a vyznačuje se značným množstvím tukových buněk (adipocytů) různých velikostí. Ty se dělí na dva typy a to na univakuolární bílé adipocyty s jádrem při okraji buňky, které převládají v dospělosti a na hnědé multivakuolární, které nacházíme převážně u novorozenců. Jejich barva je dána díky vysokému počtu mitochondrií obsahujících cytochromy. Hnědé tukové buňky jsou také zdrojem termogeneze, která výsledkem aktivity mitochondriálního proteinu thermogeninu neboli UCP1.

## **1.2 Bariérová funkce kůže**

Kožní bariéra hraje nenahraditelnou úlohu v ochraně organismu. Na jedné straně chrání před vnějšími vlivy, jakými jsou různé biologické faktory zapříčínující onemocnění, alergenů a chemikálie, na druhé straně pomáhá zachovávat homeostázu a zabraňuje ztrátě vody z organismu. Jak již bylo uvedeno výše, jednou z hlavních částí této bariéry je epider-



mální stratum corneum (SC) a její lipidový obsah. K bariérové funkci přispívají také Langerhansovy buňky, o kterých bylo pojednáno výše.

### 1.2.1 Komponenty stratum corneum

Na rozdíl od ostatních orgánů, které mají značnou funkční rezervu, kožní bariéra musí zůstat zcela zachovaná a nepoškozená. I drobné poškození SC může vést k abnormalitám v elektrolytové a vodní rovnováze, ke zvýšenému riziku vzniku infekce a vyústit v lokální nebo až systémový zánět. [17]

Hlavní funkční složkou této vrstvy jsou její mezibuněčné lipidy, které jsou vyplavovány do mezibuněčného prostoru z keratohyalinních granul. Tato granula se tvoří jako deriváty Golgiho aparátu již ve stratum spinosum a směrem k povrchu kůže se dostávají vně korneocytů, které následně obalují a vytváří tak pevnou strukturu, v literatuře často označovanou termínem „cihly a malta“. Lipidy jsou okolo korneocytů uloženy do dvou krystalických lamelárních fází s periodicitou 6,4 a 13,4 nm s tím, že z hlediska funkce kožní bariéry je fáze 13,4 nm (takzvaná LPP, neboli long periodicity phase) považována za nejvíce důležitou. [18] Největší podíl těchto lipidů přísluší volným mastným kyselinám, ceramidům a cholesterolu. Metodou stripování, tj. šetrným strháváním jednotlivých vrstev pokožky pomocí pásky, extrakcí získaných látek a jejich určením tenkovrstvou chromatografií byl získán profil jednotlivých lipidů. Bylo tak zjištěno, že hlavní složky se zde nachází přibližně v ekvimolárním poměru. Volné mastné kyseliny, jejichž hladiny jsou nejvyšší v nejsvrchnější vrstvě, mají variabilní délku řetězce v rozsahu C16 až C26. Naproti tomu ceramidy, které tvoří nejvyšší podíl lipidů SC, jsou spolu s cholesterolem přítomny napříč celou vrstvou přibližně ve stejně velkém zastoupení. [19]

### 1.2.2 Těsná spojení (tight junctions)

Zatímco desmozomy stratum basale zajišťují soudržnost buněk mezi sebou v podobě bodových propojení, těsná spojení (tight junctions, zonulae occludentes) poskytují nepropustný těsnicí spoj po celém obvodu buněk ve stratum granulosum. Tvoří semipermeabilní mezibuněčné bariéry, které regulují paracelulární difúzi. Toto mezibuněčné spojení funguje také jako intramembránová bariéra, která zabraňuje smíchání apikálních a bazolaterálních lipidů plazmatické membrány. [20] Jsou tvořeny přímým kontaktem dvou sousedních plazmatických membrán bez dalšího mezibuněčného materiálu nebo extracelulárních prostor za pomoci multiproteinových komplexů. Jako prvním identifikovaným proteinem byl

occludin, který je cílem mnoha signálních drah a považuje se za důležitý prvek z hlediska dynamiky těsných spojení. Dále se na těsných spojeních podílejí transmembránové proteiny claudiny, u nichž bylo zjištěno, že se podílí na těsnosti a selektivnímu propouštění částic skrze těsná spojení. [17]

### **1.2.3 Filaggrin**

Filaggrin je protein plnící řadu funkcí v kůži. V horních vrstvách epidermis jsou korneocyty vyplněny keratinovými vlákny, které jsou seskupeny pomocí filaggrinu. Filaggrin je také součástí pevného obalu těchto buněk, čímž se významně podílí na strukturní integritě SC. [21] Proteolýza filaggrinu v horních vrstvách SC produkuje přirozené zvlhčující faktory (NMF = natural moisturizing factors). [22]

## 2 TYPY RAN

Pojem rána představuje typ zranění, které je charakterizováno poškozením jedné nebo více vrstev kůže. V širším slova smyslu se takto také označuje poškození integrity tkáně, kam se řadí například sliznice či orgány. Existuje tak mnoho druhů dělení, níže budou vyjmenovány ty v klinické praxi nejčastěji používané.

### 2.1 Dělení dle průběhu

Podle průběhu hojení dělíme rány na akutní a chronické. Akutní rány vznikají buď úrazem, nebo chirurgickým zákrokem a jejich hojení probíhá většinou bez vážnějších komplikací. Rána tak projde jednotlivými fázemi hojení podle předpokladů.

V případě, že hojení trvá déle než 4 týdny, mluvíme o ráně chronické. [23] Chronické rány sice začínají stejně jako akutní, avšak jejich hojení neodpovídá standardnímu průběhu. Mohou vznikat i nesprávným ošetřováním. Hojení často dochází k zaseknutí na jedné nebo více fázích složité kaskády celého procesu a není jisté, jestli bude vůbec kdy úspěšně dokončeno. Chronické rány přináší kromě velkého nepohodlí pro pacienty také značnou zátěž pro zdravotnictví po celém světě. Jenom v USA bylo v roce 2007 z celkových nákladů 116 miliard amerických dolarů na pacienty s diabetem určeno minimálně 33 % na léčbu vředů chodidel [24], které tuto nemoc doprovází a jsou jedněmi z typických příkladů chronických ran.

### 2.2 Dělení dle kontaminace

Podle stupně zamoření mikroorganismy dělíme rány do čtyř skupin a to na rány čisté, kontaminované, infikované anebo kolonizované.

#### 2.2.1 Čisté rány

Čisté neboli aseptické rány vznikly při aseptických podmínkách prostředí nebo byla rána včas a dostatečně vydesinfikována a kůže tedy nebyla infikována žádnými mikroorganismy nebo jinými biologickými kontaminanty a není přítomný zánět. U takové rány tedy lze předpokládat normální průběh hojení bez komplikací. Takový typ ran vzniká například při operacích. [25]

### 2.2.2 Kontaminované rány

Od tohoto stupně dál jsou rány souborně označovány jako aseptické, neboli v ráně už nacházíme zárodky patogenních mikroorganismů či jiných kontaminantů. Při těchto ranách obvykle nedochází k infekci. Může se jednat o rány vzniklé při nehodách nebo se takto označují rány na sliznicích během chirurgických resekcí jako je například apendektomie nebo cholecystektomie.

### 2.2.3 Infikované rány

U tohoto typu rány byla kůže nebo přilehlé měkké tkáně zamořeny patogenními mikroorganismy, které se již množí a je zde tedy již značně vysoké riziko infekce. Jedná se o rány neléčené nebo například rány po kousnutí zvířetem.

### 2.2.4 Kolonizované rány

Kolonizace je typická pro chronické rány, jakými jsou například proleženiny, a způsobuje zpomalení průběhu hojení. Typickými zástupci bakterií u těchto typů ran jsou anaerobní druhy jako je *Peptostreptococcus* spp, *Bacteriodes* spp., *Clostridium* spp. Popřípadě kolidiformní bakterie, zatímco zástupci typičtí pro akutní rány (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) se v těchto ránách nevyskytují. [26]

## 2.3 Dělení dle rozsahu

### 2.3.1 Zavřené rány

Rány tohoto typu vznikají při tupém úderu, jako je například pád na zem, pád těžkého předmětu na postižené místo nebo například během autonehod. Ačkoli je pro ně typické zjevné neporušení pokožky, dochází k poškození podpovrchových tkání, neřídka kdy až na samotnou kost. Dle těchto poškození nejčastěji rozlišujeme dva typy ran a to hematom (modřina) a kontuzi (pohmoždění).

#### **Hematom**

Vzniká poškozením krevních cév vlivem silného tlaku a vylitím krve do okolní tkáně. Dle velikosti je dělíme na petechie, ekchymózy, surfuze a purpuru. Menší hematomy odeznívají během několika dní, u velkých je v některých případech nutné odsátí krve. Komplikace mohou nastat také při užívání léků na ředění krve, jako je například heparin, nebo při vzniku místního zánětu doprovázeného otokem a bolestí.

Podpovrchové hematomy se projevují jako barevné oblasti, kdy po krátké době se barva mění z růžové na modrou až fialovou kvůli deoxyhemoglobinu ve venózní krvi. Ta má větší absorpční koeficient v červené oblasti a v odraženém světle tak převládá modrá složka nad červenou. [27] V průběhu následujících dní dochází k lýze erytrocytů a vyplavení hemoglobinu, který se oxiduje na methemoglobin a následně podléhá metabolickým změnám na pigmenty biliverdin a bilirubin [28], což má za následek změnu barvy modřiny přes zelenou až po žlutou.

### **Kontuze**

Pohmoždění vzniká působením tupého předmětu menší intenzitou. Projevuje se lehce zvýšeným začervenáním podmíněným rozšířením kožních cév a otokem. Brzy mizí, někdy již za několik hodin. [29] V případě silnějších úderů mohou pohmoždění způsobit popraskání svalových vláken v místě úderu a přilehlém okolí, což typicky zapříčiní tvorbu hematomů i ve svalech. [30] Intramuskulární hematomy způsobují nárůst tlaku ve svalu díky neporušené povázce. Tento tlak způsobí kompresi kapilár, zastavení krvácení, avšak je doprovázen značnou bolestí. [31]

### **2.3.2 Povrchové rány**

Tento typ ran zasahuje jen do horních vrstev kůže, tedy do pokožky a škály. Nejčastěji jsou způsobeny třením o abrasivní povrch, přičemž vznikají takzvané odřeniny. Další možností je pořezání, škrábnutí, lehká popálení a omrzliny, chemické poleptání a tržné rány. Povrchové rány jsou často spojené s menším krvácením a hojí se primárním hojením.

### **2.3.3 Hluboké rány**

Tyto rány již zasahují do podkoží a dále a jsou tak ohroženy svaly, vazy, šlachy a orgány uložené pod nimi. V takovém případě již hrozí poranění velkých tepen a žil, a kromě vnějšího je zde i riziko vnitřního krvácení do dutin. Hluboké rány se hojí převážně sekundárním hojením.

Mezi tento typ ran patří například:

#### **Řezné rány**

Většinou čisté dobře se hojící rány způsobené ostrým předmětem, jako je například nůž, střep nebo plech, u kterých je však vysoká pravděpodobnost zasáhnutí většího počtu cév a tím způsobené silné krvácení.

### **Sečné rány**

Sečné rány jsou velice podobné předchozímu typu, neboť mívají taktéž hladké okraje a jsou způsobeny ostrými předměty či nástroji, jejichž ostří dopadá velkou silou na povrch kůže. Na rozdíl od řezných ran je zde však často menší krvácení, protože dochází ke zhmoždění cév a tkání. Tvar a závažnost takových ran je závislá na ostrosti nástroje, síle úderu a jeho úhlu. Ostří v místě seknutí může také způsobit doprovodné klasické řezné rány.

### **Tržné rány**

Vznikají natržením nebo pořezáním kůže a jsou tak často zaměňovány za rány řezné, avšak jejich okraj je do jisté míry vždy nepravidelný. Mohou být jak povrchové, tak zasahující až do tkání pod kůží. Bývají většinou také větším rizikem průniku mikroorganismů do těla a předměty, které je způsobily, mohou zanechat v ráně rezidua. Součástí léčby je tedy velice řádné vyčištění rány.

### **Bodné rány**

Tento typ rány je způsoben špičatým předmětem, který může proniknout velice hluboko. Je zde sice menší riziko krvácení, nicméně o to větší je nebezpečí zanesení patogenů do těla. Vzhledem k elasticitě tkání, které se ihned po vyjmutí bodného předmětu opět stahují, je na první pohled obtížné určit hloubku zasažení. To s sebou nese riziko opomenutí některého z dílčích poranění.

### **Pokousání**

Rány z pokousání zahrnují celou škálu závažnosti od povrchových zranění, přes vážné poranění až po znetvořující až smrtelné rány. K tomu je třeba počítat i s rizikem kontaminace mikroorganismy, protože i relativně drobné ranky mohou způsobit infekci a proto je třeba přistupovat ke každému pokousání jako k zranění s možnými následnými komplikacemi. [32]

### **Střelné rány**

Rány vzniklé palnými zbraněmi jsou velice komplexní a jejich charakter závisí na několika faktorech, jako je vzdálenost cíle od ústí hlavně, zasažená část těla, ráže a typ použitého střeliva a jeho úhel vniknutí.

Co se týče samotného poranění kůže, vykazuje drtivá většina míst vstřelu náboje zónu zarudlé obroušené epidermis okolo vstupního otvoru, která se nazývá obrusný prstenec

(„abrasion ring“) a jeho vznik je připisován jak třením náboje o epidermis, tak krátkodobým přepětím kůže, než dojde k její perforaci a proniknutí náboje do hlubších vrstev tkání. Vzhledem k rigiditě a síle kůže na dlaních, ploskách nohou a loktech, se obrusný prstenec na těchto místech nevyskytuje. [33]

Za vstupním otvorem kulka v závislosti na kinetické energii postupuje dál a tvoří takzvaný střelný kanál, nebo se rozpadá na menší fragmenty. V případě dostatečné síly je schopna projít skrz celou masu a opustit tělo, což se označuje jako takzvaný průstřel. Během své trajektorie v těle postupně deformuje jak sama sebe, tak tkáň, se kterou se dostává do kontaktu a rozráží ji. Tím na velice krátkou dobu, přibližně na 5-10 ms, vytváří v těle dutinu o průměru až 12,5 násobku svého vlastního průměru. Velikost této dutiny závisí na velikosti ráže a množství kinetické energie, kterou na své cestě skrz tkáň ztrácí, závisí a dále také na poddajnosti okolních tkání a orgánů vůči takovýmto náhlým změnám, kdy například svalová hmota se v tomto případě lépe přizpůsobí než jaterní tkáň. [34]

Pokud kulka pronikne skrz, vzniká výstupní otvor takzvaný výstřel. Ten bývá typicky větší než vstupní otvor a to ze dvou důvodů. Tím prvním je deformace projektilu a tím pádem zvětšení plochy kolmé na směr jeho trajektorie a tím druhým je nestabilita projektilu a jeho rotace, což může při dostatečně dlouhé dráze způsobit jeho celkové překlopení a vyústění na výstřelu jeho širokou základnou. [33]

U střelné rány je kromě infekce třeba také v případě střelby z blízka počítat s popáleninami a tlakovými defekty způsobenými žhavými plyny a dále s rezidui pláště náboje, nespáleným střelným prachem a mastnotou z hlavně, které doprovází projektil a mohou se vrýt do kůže a tkání v těsné blízkosti jeho trajektorie. [35]

## 2.4 Dělení dle způsobu hojení

Podle rozsahu a stavu rány se k jejímu hojení přistoupí podle jednoho ze tří způsobů pro dosažení co nejlepšího výsledku a pokud možno zkrácení hojení na minimální možnou dobu.

### 2.4.1 Primární hojení

Tento typ hojení nacházíme pouze u povrchových a nepříliš hlubokých čistých akutních ran, které jsou uzavřeny během 12 až 24 hodin od svého vzniku. Jedná se tedy například o čisté lacerace nebo drobné chirurgické řezy, kde můžeme obě strany řezu přiložit k sobě. Není narušena kontinuita bazální membrány a poškozeno je relativně malé množství epite-

liálních buněk a buněk přilehlé pojivové tkáně. Okraje rány jsou spojeny k sobě pomocí stehů, speciálních tkáňových lepidel, pásek či jiných pomůcek a hojení probíhá relativně rychle a bez komplikací. [36] Primární hojení je tak nejlepším způsobem zacelení rány, protože v místě rány zůstává pouze drobná jizva, což je pozitivum jak z pohledu funkčnosti tkáně, tak z kosmetického hlediska.

#### 2.4.2 Opožděné primární hojení

Opožděné primární hojení se objevuje v případě, že uzavření rány je opožděno o 3 až 6 dní. Tento typ hojení se uplatňuje při výskytu nežádoucích podmínek, jako je například špatná vaskularizace, nekontrolovatelné krvácení nebo podezření na zvýšené riziko infekce. [37] K tomuto hojení se často přistupuje u válečných zranění, kdy je rána vytvořena nárazem o vysoké energii, nebo u zranění, která vyžadují použití kožního štěpu, a je tedy třeba mít nejdříve ránu zcela čistou.

Kůže a podkožní vazivo je ponecháno bez jakéhokoli zásahu a rána se uzavírá až poté, co je rána vyčištěna například pomocí pacientových obranných mechanismů, nebo pomocí čistících roztoků a antibiotik. Metabolismus kolagenu zůstává zachován a kůže si zachovává svou pevnost v tahu stejně, jako by byla uzavřena ihned jako v případě primárního hojení. [36] Také kosmetický výsledek bývá shodný jako u primárního hojení.

#### 2.4.3 Sekundární hojení

Tento typ hojení se uplatňuje v případě velké ztráty měkké tkáně jako je tomu u těžších poranění, vážných popálenin nebo některých chirurgických zákroků, v případě nekrotické tkáně v ráně, nebo pokud je v ráně cizí těleso. V takovém případě buď nelze kvůli velké ztrátě tkáně obě strany snadno k sobě připojit, jako je tomu u primárního hojení, nebo hrozí v případě uzavření rány k pomnožení anaerobních bakterií a dalším s nimi spojeným komplikacím. Regenerace epiteliálních buněk sama o sobě nedokáže navrátit původní strukturu kůže, takže dochází k růstu granulační tkáně z okrajů rány následované nahromaděním extracelulární hmoty a ukládáním vláken kolagenu. [36]

Tento typ hojení trvá mnohem déle než předchozí dva a zanechává po sobě velké fibrózní jizvy, protože rána je nyní zacelena pomocí granulační tkáně, která akumuluje velké množství kolagenních vláken. Rovněž funkce kůže je v takovém místě na rozdíl od primárního hojení značně omezena a kosmetický výsledek také není uspokojivý.



### 3 FÁZE HOJENÍ

Hojení rány je velice komplexní proces vzájemně se prolínajících pochodů, který vyžaduje naprosto přesnou koordinaci všech dílčích činitelů. Jakákoli odchylka může celou kaskádu dějů narušit a tím celý průběh hojení zkomplikovat, změnit stav rány z akutní na chronickou, případně přinést nová rizika.

Hojení akutních ran probíhá ve 3-4 fázích (dělení se liší dle literatury, první dvě fáze bývají často spojeny v jednu, takzvanou exudativní fázi) a účastní se jí celá řada buněk a biochemických dějů. Podstatnou roli při remodelaci tkáně hrají růstové faktory.

#### 3.1 Růstové faktory

Růstové faktory je celá řada přirozeně se vyskytujících signálních polypeptidů poměrně krátkého poločasu rozpadu produkovaných různými buňkami těla, které stimulují některé buňky k odpovědím pomocí interakce s jejich specifickými receptory, nejčastěji s G-proteiny párovanými receptory. G-proteiny se aktivací pomocí vnějšího faktoru rozpadnou na podjednotky  $\alpha$  s navázaným GTP a  $\beta\gamma$ -podjednotku, které reagují s efektorovými proteiny. G-protein se vrací opět do svého základního stavu pomocí enzymu GTPázy, kdy se GTP v podjednotce  $\alpha$  přemění na GDP a následně se připojí podjednotka  $\beta\gamma$ . G-proteiny tak prochází cykly aktivace a inaktivace a jsou tak schopné fungovat jako molekulární spínač. [38]

Růstové faktory jsou schopné iniciovat procesy jako je buněčná proliferace při hojení ran, angiogeneze, osteogeneze, zrání buněk či jejich diferenciaci. Jejich působení je většinou parakrinní, účinek růstových faktorů je tedy pouze lokální v okolí místa jejich syntézy.

#### 3.2 Fáze hemostatická

Jedná se o relativně krátké období, na jehož začátku dochází k vylití krve z poškozených drobných cév do rány. Následuje velice rychlá odpověď organismu, která vyústí v zastavení krvácení, odkud nese tato fáze hojení svůj název.

V prvním kroku dochází k vasokonstrikci drobných cév díky aktivitě hladké svaloviny jejich stěn a vyplavením látek z poškozených endotelových buněk. Následuje tvorba krevní sraženiny za účasti krevních destiček neboli trombocytů. Za normálních podmínek neporušené endotelové buňky uvolňují oxid dusnatý a prostacyklin  $\text{PGI}_2$ , které zabraňují trombocytům se shlukovat. Avšak u poškozené cévy dochází k obnažení kolagenové vrstvy v její

stěně a trombocyty velice ochotně začínají ulpívat ke kolagenním vláknům. Toto pouto je stabilizováno pomocí von Willebrandova faktoru. Trombocyty zmohutní, vytvoří ostnitě výběžky a stanou se více adhezivní. K tomu navíc uvolňují chemické posly, jejichž úkolem je zajistit vazbu dalších trombocytů a posílit uzavření cév. Tímto dochází ke kumulativnímu shlukování trombocytů a velice brzy se vytvoří zátka, která zabraňuje dalšímu krvácení. Následuje koagulace neboli srážení krve, které dále posílí zátku utvořenou trombocyty. Na srážení se podílí takzvané prokoagulanty nebo srážecí faktory. Jedná se o plazmatické proteiny označované římskými číslicemi I až XIII, které jsou syntetizovány v játrech. Pro syntézu čtyř z nich je nezbytný vitamin K. Koagulace může probíhat dvěma cestami a to buď vnitřní (faktory použité ke srážení pochází z poškozené cévy) nebo vnější (rychlejší, faktory se nachází vně poškozené cévy v okolní tkáni). Kaskádovitou aktivací jednotlivých faktorů dojde na konci obou cest k aktivaci pro obě cesty společného faktoru X. Jakmile je aktivní, naváže se na vápenatý ion a faktor V za vzniku protrombinového aktivátoru. Ten následně katalyzuje přeměnu neaktivního protrombinu v aktivní trombin. Tím nastává poslední část koagulace, kdy trombin katalyzuje rozpustný srážecí faktor fibrinogen na nerozpustný fibrin za tvorby dlouhých fibrinových vláken. Ta nejenom pevně spojují trombocyty mezi sebou, ale také mění tekutou krev na gel záchytem červených krvinek. [39] Pevná síť fibrinových vláken zároveň do určité míry pojí k sobě obě stěny rány. Mezitím se na povrchu rány se vytváří pevná krusta z vyschlé krve s vysokým obsahem fibrinu a tkáňového moku, která se také označuje jako strup. Ten je důležitý primárně pro zachování vlhkosti rány, která je nezbytná jednak jako ochrana před vysycháním nově vznikajících ran a jednak jako optimální prostředí pro snadnou difúzi růstových faktorů.

Trombocyty v ráně uvolňují svá alfa granula, která uvolňují některé růstové faktory jako jsou PDGF, IGF-1, EGF nebo TGF- $\beta$ . Tyto látky přitahují a aktivují fibroblasty, endotelové buňky a makrofágy. [36]

### 3.3 Zánětlivá fáze

Jak mnohé záznamy a jiné archeologické nálezy naznačují, koncept zánětu je znám v medicíně již od starověkého Egypta. [40] Tato fáze je místní odpovědí organismu u každé vzniklé rány, případně při vzniku infekce a jejím cílem je ránu řádně vyčistit od mikroorganismů a jiného nežádoucího biologického materiálu včetně odumřelých nekrotických buněk, aby mohla následně začít probíhat tvorba nové tkáně. Hlavní úlohu zde mají buňky, které fungují jako fagocyty, jako jsou neutrofilny, makrofágy a dendritické buňky-

Na počátku zánětlivé reakce jsou buňkami v ráně včetně endotelových buněk poškozených cév vyplaveny chemotaxiny, které působí na neutrofilní granulocyty volně plovoucí v krevním řečišti. Mezi takové chemotaxiny můžeme řadit komponenty komplementu, což je soubor asi 40 glykoproteinů, které spolu s interferony a dalšími plazmatickými proteiny slouží jako humorální složka nespecifické imunity. Komponenty komplementu jsou aktivovány v plazmě a tělesných tekutinách a účastní regulace prakticky všech fází akutní zánětlivé reakce, včetně změn v cévním průtoku krve, velikosti lumen cév a zvýšení vaskulární permeability pro leukocyty. To je způsobeno up-regulací adhezních molekul na povrchu endotelových buněk a leukocytů. [41] Takovým produktem je kupříkladu komplement C5a, u kterého bylo zjištěno, že reguluje základní procesy buněk neutrofilních granulocytů zvýšením elasticity membrány a velikosti buněk v důsledku polymerace a reorganizace aktinového cytoskeletu, což vytvoří z neutrofilů migrační buňky schopné proniknout do zánětlivého místa. [42] Tomuto průniku předchází zvyšování adheze neutrofilů k povrchu endotelu, což způsobí takzvané „plazení se“ po povrchu endotelových buněk až do doby, kdy neutrofil narazí na mezeru mezi dvěma endotelovými buňkami. Jakmile se tak stane, vsune mezi jejich cytoplasmatické membrány svůj výběžek a postupně se celý protáhne skrze cévu, aniž by způsobil její porušení. [43]. Mezi další chemoatraktanty můžeme řadit například TGF- $\beta$ , bakteriální n-formylmethionin, cytokiny a další mediátory zánětu.

Neutrofilní granulocyty se dostávají do rány poměrně rychle a už během jedné až dvou hodin zaznamenáváme v ráně jejich relativně vysokou koncentraci. Jakmile se tak stane, začnou ihned fagocytovat přítomné bakterie a jiné cizí částice, které následně enzymaticky rozkládají nebo likvidují pomocí volných kyslíkových a jiných radikálů, které vznikají převážně aktivitou enzymu NADPH oxidázy. [44] Aktivita neutrofilů většinou končí během jednoho až dvou dnů apoptózou neutrofilů, kdy je rána vyčištěna a nepředstavuje již vhodné prostředí pro množení bakterií. Toto období bývá často také označováno jako časná fáze zánětu.

V další, pozdní fázi zánětu, neutrofilů pomocí uvolněných cytokinů včetně dalších chemoatraktantů přitahují do místa rány monocyty, které se zde přeměňují v makrofágy. Ty hrají velice důležitou roli v hojení rány, neboť kromě toho, že fagocytují zbylé bakterie a samotné neutrofilů, produkují a uvolňují růstové faktory, které se podílí například na produkci ECM fibroblasty, proliferaci buněk hladké svaloviny nebo na angiogenezi novotvořením endotelových buněk. Zároveň také bakteriální endotoxiny stimulují přítomné

makrofágy k produkci enzymu kolagenázy, která štěpí vlákna kolagenu a pomáhá tak s dočištěním rány. [45]

Mezitím dochází v této fázi také k odstranění krevní fibrinové sraženiny. V krvi se přirozeně nachází plazmatický protein nazývaný plazminogen, který se v průběhu času ve sraženině mění proteolytickým štěpením na plazmin za pomoci dvou hlavních trombinem stimulovaných aktivátorů, a to tkáňového t-PA a aktivátoru izolovaného z moči u-PA. Plazmin má enzymatické vlastnosti a patří mezi širokospektrální proteázy. V krevní sraženině štěpí fibrinová vlákna, čímž dojde k jejímu odstranění. Podílí se tak také například na kontinuálním rozpouštění malých trombů převážně v mikrocirkulaci. Vzhledem k tomu, že je potřeba udržovat fibrinolytický systém v rovnováze, existují také inhibitory plazminu, které se spolu s dalšími regulačními mechanismy podílejí na jeho správné funkci. Aktivita tohoto systému totiž musí být regulována jak lokálně, tak i časově, aby například nedocházelo k předčasnému obnovení krvácení. [46]

### 3.4 Proliferativní fáze

V této fázi se hlavní role ujímají fibroblasty přitahované do místa poškození tkáně řadou růstových faktorů (PDGF, TGF- $\beta$ ) a začínají produkovat kolagenní vlákna, čímž dochází ke zpevnění rány a zajištění opory pro nově vznikající buňky. Navíc fibroblasty secernují do rány na glykoproteiny bohatou ECM, která zaplňuje prostory mezi jednotlivými kolagenovými vlákny a zajišťuje ideální prostředí pro ostatní struktury a jiné komponenty podílející se na procesu hojení.

Makrofágy přítomné v ráně začínají produkovat růstové faktory (VEGF = vascular endothelial growth factor), které působí na endotelové buňky přilehlých cév. Ty spustí kaskádu intracelulárních signálních drah, jejichž výsledkem je secernace proteolytického enzymu, který naruší bazální membránu cévy a endotelové buňky mohou proliferovat a díky orientaci pomocí integrinů ( $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ) postupovat směrem k ráně. [47] Tím iniciují angiogenezi, která zajistí dodávku živin a kyslíku, který je naprosto klíčový pro mnohé biochemické pochody během hojení včetně správné funkce růstových faktorů. [48] Nově se tvořící klubka cév společně s fibroblasty, ECM, makrofágy a vazivem tvoří růžovou relativně křehkou granulační tkáň, která je pro tuto fázi hojení typická.

Z okrajů rány začíná proces reepitelizace, který je iniciován kmenovými epiteliálními buňkami vlasových folikulů či potních žláz a keratinocyty při okrajích rány. Tato vznikající

nová vrstva pokrývá provizorní výplň rány tvořenou granulační tkání a chrání ji před vysycháním a zajišťuje ochranu před mikroorganismy. Epitelizace probíhá pod strupem, který tuto vrstvu chrání před vysycháním a jakmile je proces ukončen, strup se sám uvolní. Vzhledem k absenci strupu u ran, které se hojí sekundárně, je třeba zajistit vlhkost vhodným krytím.

### **3.5 Epitelizační (diferenciační) fáze**

V této fázi jsou kolagenová vlákna neustále odbourávána a znovu syntetizována. To vede k jejich paralelní organizaci a zpevnění rány. Jizvová tkáň z počátku stále ještě obsahuje velké množství cévních svazků pocházejících z granulační tkáně a jeví se tak na povrchu jako červená jizva.

S postupem času se volně rozptýlené fibroblasty spojují do vláknitých struktur a diferencují na myofibroblasty, které jsou stejně jako buňky hladké svaloviny schopny kontrakce a přitahují protilehlé strany rány k sobě. To jednak zmenšuje velikost rány a jednak snižuje množství vaskularizace v jizvě, která začíná blednout.

## 4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ HOJENÍ RAN

Aby se rána správně hojila, je nezbytné, aby prošla všemi precizně řízenými fázemi (hemostatická, zánětlivá, proliferativní, epitelizační) ve správném pořadí. Jakékoli narušení tohoto harmonického procesu může vyústit v komplikace a hojení prodloužit. Dle původu rozdělujeme faktory ovlivňující hojení ran na lokální a systémové.

### 4.1 Lokální faktory

Jedná se o takové okolnosti, které přímo ovlivňují vlastnosti samotné rány.

#### 4.1.1 Velikost, typ a umístění rány

Jak již bylo uvedeno výše, rozsah rány určuje, zda se bude hojit primárním nebo sekundárním hojením. U obou je kromě velikosti rány podstatný také jejich typ, který určuje, jak k sobě obě protilehlé strany doléhají. Pro správné hojení je totiž třeba, aby rána, ve které vnikají relativně křehké struktury, byla v mechanickém klidu. To je například problém, pokud je rána v místě nebo těsné blízkosti kloubu. [49]

#### 4.1.2 Stav tkáně a cizí tělesa v ráně

Během úrazu dochází k poškození buněk, které následně odumírají a vzniká tak nekrotická tkáň. Většinu nekrotické tkáně pohltí makrofágy a neutrofilní granulocyty, nicméně v některých případech, například u popálenin, nemusí dojít k jejímu kompletnímu odstranění přirozeným způsobem. Tyto poškozené buňky jsou poté zdrojem živin pro bakterie a také jim poskytují vhodné podmínky k životu a množení, tedy tvoří vhodné podmínky pro infekci. Navíc během hojení probíhá reepitelizace pouze na jiných živých buňkách, proto je zcela zásadní nekrotickou tkáň zcela odstranit. [50] To se provádí metodou zvanou debridement.

Nekrotická tkáň se také může změnit v tekutou viskózní krémově žlutou hmotu známou také jako hnis, který obsahuje díky leukocytárním enzymům kompletně rozložené mrtvé buňky. [51] Hnis je třeba také odstraňovat, protože představuje vhodné prostředí pro migraci mikroorganismů hlouběji do tkáně.

Cizí tělesa jsou také spojena s infekcí jakožto vektory mikroorganismů, mohou způsobovat toxické nebo alergické reakce [52] a navíc stejně jako u nekrotické tkáně musí nové živé buňky růst přes další živé buňky. Z tohoto důvodu je vždy třeba důkladně odstranit všechna cizí tělesa z rány.

Pro hojení je zcela zásadní také teplota tkáně a těla celkově, kdy je třeba zamezit podchlazení. Masivní krvácení sice zastaví zchlazení okolí rány, jakmile je však zahájena hemostatická fáze, je třeba udržovat teplotu organismu okolo přirozených 37 °C, protože při této teplotě fungují enzymy lidského těla, mnohé nezbytné pro hojení, nejlépe. [53]

#### 4.1.3 Infekce

Infekce bývá jednou z nejčastějších komplikací při hojení ran a nastává v momentě, kdy dojde k proniknutí patologických agens (bakterie, viry nebo plísně) do rány. Přítomné mikroorganismy neustále napadají poškozenou tkáň, rozkládají kolagen, způsobují buněčný stres a rána tak nemůže přejít ze zánětlivé fáze do proliferativní a z akutní rány se stává chronická. [54]

Takové nákaze může dojít i během pobytu ve zdravotnickém zařízení a to jak v ambulanci, tak i v lůžkové části. Jedná se o takzvané nozokomiální nákazy [55], které mají původ v celé řadě patogenů. Mezi jedny z nejvíce obávaných patří methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), jejichž prevalence neustále stoupá. [56] Patogen vniká do kůže skrze ránu nebo i drobnými oděrkami a způsobuje celou řadu komplikací. Mezi nejčastější a vysoce nakažlivé řadíme impetigo, neboli infekční zánět postihující hlavně povrchovou vrstvu kůže a projevující se drobnými puchýřky, dále abscesy a furunkuly. Při vniknutí této bakterie do rány dochází ke vzniku zánětu podkoží neboli cellulitis, vzniku furunkulů a nebo obojího a ránu je třeba znovu otevřít a v mnoha případech nechat zhojit sekundárním hojením. [57]

#### 4.1.4 Nedostatečné zásobení rány krví

Pro tvorbu granulační tkáně je typická zvýšená buněčná hustota a buněčná aktivita, které jsou mimo jiné spojené se zvýšenými nároky na zásobení kyslíkem a živinami. [58] Normální krevní cirkulace a přísun živin a kyslíku je tedy zcela zásadní pro řádné hojení. Jednou z častých komplikací je ischemie, kterou lékařské slovníky definují jako nedostatečný průtok krve do části těla způsobený zúžením nebo blokádou krevních cév danou oblast zásobujících. [59]

Cévní zásobení může být narušeno už jen mírně zvýšeným tlakem na ránu, například působením nevhodně přiloženého krytí či stažené bandáže. Podobné komplikace nacházíme u zranění, která byla spojena se silným tupým nárazem, kdy často dochází ke zhmoždění a k omezení přítoku krve do rány. To má za následek snížení schopnosti správného hojení.

## 4.2 Systémové faktory

Tyto vlivy jsou dány celkovým zdravotním stavem a regulují tak schopnost jedince se uzdravovat.

### 4.2.1 Diabetes mellitus (DM)

Toto chronické metabolické onemocnění vzniká absolutním (DM typu I) nebo relativním (DM typu II) nedostatkem inzulínu a kromě přímo související hyperglykémie, způsobuje celou řadu zdravotních komplikací. Dle statistik WHO postihuje toto onemocnění aktuálně přibližně 463 milionů lidí po celém světě.

Za komplikacemi hojení ran při DM stojí vysoká hladina glukózy v krvi, která má za následek zvýšení mitochondriálního oxidativního stresu a následné apoptózy endotelových buněk. [60] Vzhledem k tomu, že endotelové buňky jsou nezbytné pro angiogenezi, následný pokles novotvorby a diferenciací cév výrazně prodlužuje hojení a rány se často stávají chronickými. Při pokusech na myších bylo rovněž zjištěno, že během diabetu dochází k narušení přeměny monocytů na makrofágy, a tím se hojení stává nedostatečné. [61]

Glukóza je také preferovaným zdrojem výživy pro mnohé druhy bakterií [62] a její zvýšená hladina v krvi tak představuje komplikaci z pohledu regulace bakteriálního množení a růstu.

Nežádá, kdy je diabetes také doprovázen takzvaným bérčovým vředem, což je závažné chronické onemocnění především u lidí vyššího věku, pro něhož je charakteristická různě hluboká ztráta kožní substance. Je projevem venózní ulcerace, která je terminálním projevem nedostatečné funkce žil. Jeho lokální léčba se zaměřuje především na moderní krycí materiály zajišťující vlhké prostředí, kombinovanou s kompresní terapií. [63]

### 4.2.2 Věk a stav imunitního systému

Během života prochází lidský organismus celou řadou změn v závislosti na životosprávě, genetické výbavě, místě pobytu a dalších faktorech. Společně s těmito vlivy dochází k celkovému zpomalení metabolických procesů. Bylo prokázáno, že hojení ran probíhá jinak u mladších lidí než u starších, avšak jedná se spíše o rozdíl v době hojení než samotné výsledné kvalitě. S věkem se v kůži snižuje mikrocirkulace, lymfatická drenáž i obsah kolagenu a antigen-prezentujících buněk (například Langerhansovy buňky). [64] Na změnách v kůži se významnou mírou podílí působení UV světla z nadměrného a dlouhodobého opa-



lování, označované jako photoaging. Přímým vystavením záření o vlnových délkách vyšších jak 290 nm (tím pádem došlo k eliminaci UV-C) byla zjištěna vyšší aktivita 3 metaloproteináz (kolagenáza, 92-kd gelatináza a stromelysin), které degradují kožní kolagen. [65]

#### 4.2.3 Životní styl a strava

Pestrá a vyvážená strava je jedním ze základních předpokladů pro zdravý životní styl a s ním spojené i správné hojení ran. Během kožní reparace je aktivována celá řada biochemických procesů, pro jejichž chod je zapotřebí kromě energie také značné množství základních živin. Nedostatek minerálů (převážně zinku) a bílkovin, jejichž aminokyseliny slouží jako základní stavební prvky tkáňového růstu, představuje zvýšené riziko tvorby chronických vředů, oslabení kůže, alopecii nebo špatný vývoj nehtů. [66]

Role tuků v lidském organismu je nenahraditelná vzhledem k jejich podílu na stavbě buněčných fosfolipidových membrán, nebo roli zásobárny energie. Jsou také důležité z hlediska syntézy buněčné hmoty a uplatňují se i při zánětlivých reakcích. [66] U některých nenasycených mastných kyselin byl také prokázán pozitivní účinek u hojení ran. [67]

V lidském těle jsou cukry štěpeny v lumen střeva za účasti enzymů  $\alpha$ -amylázy ze slin a pankreatu na oligosacharidy a ty jsou následně spolu s disacharidy z potravy štěpeny celulárně v kartáčovém lemu enterocytů na monosacharidy glukózu, fruktózu a galaktózu. Převážně glukóza je klíčovým zdrojem energie pro celý organismus [46] a je tedy i důležitým prvkem v procesu hojení ran. [68]

Zinek je i přes svou relativně nízkou koncentraci (méně jak 50 mg/kg) jedním z nejdůležitějších minerálů v lidském těle nejenom z pohledu hojení ran. Slouží jako kofaktor celé řady metaloenzymů potřebných pro opravy buněčných membrán, buněčnou proliferaci a správnou funkci imunitního systému. Schopnost zinku zvýšit aktivitu trombocytů je důležitým předpokladem pro přechod do zánětlivé fáze hojení. Toho dosáhne uvolněním alfa-granul z trombocytů, které obsahují celou řadu proteinů a faktorů majících za následek přivolání a aktivaci buněk imunitního systému do místa poranění. [69]

Z vitamínů je zcela zásadní vitamín C, který kromě toho, že působí jako antioxidant zachytávající volné kyslíkové radikály [46], je také nezbytný pro syntézu kolagenu [1] a jeho fyziologické koncentrace přispívají ke zlepšení proliferace endotelových buněk cév. [70]

Dalším důležitým vitamínem je vitamín A, který je dodáván z potravy jednak jako v podobě esteru vyšších mastných kyselin a retinolu a jednak jako karoten. [46] U retinoidů byl prokázán jejich vliv na diferenciaci a růst mnoha buněčných typů, v procesu hojení rány jsou také schopné zvrátit inhibiční účinky protizánětlivých steroidů. [71]

Na hojení ran má také značný vliv kouření. Cigaretový kouř obsahuje více jak 4000 toxic-  
kých látek, mezi které patří především nikotin, oxid uhelnatý a kyanovodík. Nikotin zvyšuje přilnavost krevních destiček k cévním stěnám a tím zvyšuje riziko vzniku mikrovasku-  
lárních trombóz. Dále snižuje novotvorbu červených krvinek, fibroblastů a makrofágů. Jako vazokonstriktor omezuje nikotin krevní zásobení, které má za následek zpomalení průběhu hojení [72]

Vzhledem k tomu, že má oxid uhelnatý mnohem větší afinitu k hemoglobinu než kyslík, vzniká tak karboxyhemoglobin HbCO a kyslík se tak již nemůže navázat a jeho funkce v dýchání je narušena. Vzhledem k tomu, že se karboxyhemoglobin rozkládá 200krát po-  
maleji, než kdyby byl na hemoglobin navázán kyslík, ke smrtelné otravě dochází již při velmi malé koncentraci oxidu uhelnatého ve vdechovaném vzduchu. [46] Bylo také prokázáno, že kouření snižuje koncentraci vitamínu C v krvi a to jak u aktivního, tak i pa-  
sivního kouření. [73]

#### 4.2.4 Pohyb a duševní stav

Celkový psychický stav do jisté míry může ovlivňovat délku hojení. U pacientů trpících úzkostí a depresí byl prokázán statisticky významný rozdíl v délce hojení ran, než u paci-  
entů bez psychických poruch, kteří se zotavovali relativně rychleji. [74] Zároveň byl z hlediska hojení prokázán pozitivní účinek morální podpory okolí na regulaci negativních účinků stresu. [75]

## 5 KOMPLIKACE PŘI HOJENÍ RAN

Celkový stav pacienta a charakteristika rány s jistou dávkou pravděpodobnosti předurčují charakter jejího hojení. V mnoha případech se tak i přes sebelepší ošetřující zákrok a následnou péči mohou projevit určité komplikace, které prodlužují délku hojení, případně zhoršují jeho výsledek. Nežřídko kdy je třeba do rány znovu chirurgicky zasáhnout. Je tedy důležité hojení průběžně monitorovat, použít vhodné krytí a včas odhalit případné komplikace. [76]

### 5.1 Dehiscence rány

Dehiscence neboli rozestup rány je pooperační komplikace, která představuje vážné ohrožení zdraví pacienta. Riziko přináší případné krvácení, možnost infekce nebo zanesení cizích těles do rány. Může vznikat samovolně vlivem lokálních a systémových faktorů [77], nebo jako následek zranění, případně nadměrné zátěže na ránu. V závislosti na velikosti rány je třeba následný chirurgický zákrok u velkých ran s rozestupem všech vrstev kůže, nebo lokální ošetření u menších ran. [78] Rozestupu rány může také předcházet i zvýšený nitrobřišní tlak. [79]

### 5.2 Krvácení rány a poruchy srážlivosti krve

Krvácení z rány je velice typickou komplikací a má více možných příčin. Až v polovině případů hraje hlavní roli nedostatečná srážlivost krve způsobená reziduem heparinu v organizmu. U pacientů, kteří nemají dostatečný přísun živin a jsou jim podávány antibiotika, je velice důležitá suplementace vitamínu K, na jehož hladině závisí srážecí faktory II, VII, IX a X. [80]

Další a velice nebezpečnou příčinou postoperativního krvácení rány může být takzvaná diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC). Při této komplikaci dochází k tvorbě mnohočetných rozptýlených krevních mikrosraženin, které způsobují difúzní poškození tkáně s následným difúzním krvácením. Příčinou DIC může být uvolnění zbytků tkání do krevního řečiště, zvýšené shlukování trombocytů, poškození endotelové výstelky a obnažení cévní stěny vedoucí ke zvýšené adhezi trombocytů nebo nízký krevní tlak, který zpomalí krevní oběh a inhibitory srážení se tak nemohou dostat včas k místům s mikrosraženinami. [80]

### 5.3 Hypertrofní jizva

Vytvoření jizvy během hojení je zcela fyziologickým jevem, avšak v některých případech, obzvláště u popálených pacientů, může vlivem některého z mnoha faktorů dojít k tvorbě fibrotické jizvy obsahující značné množství kolagenu III. [81], která se projevuje vyvýšeným povrchem, ztuhnutím, zarudnutím a bývá kosmeticky nežádoucí. Příčinou vzniku tohoto typu jizev je přímé i nepřímé zapojení krevních destiček, T-lymfocytů, makrofágů, keratinocytů a Langerhansových buněk do procesu aktivace myofibroblastů, které začnou produkovat nadměrné množství ECM. [82]

### 5.4 Nekrotická rána a gangréna

Nekrózu lze považovat za typ buněčné smrti, která má značnou část charakteristických znaků shodných s apoptózou. Může se jednat například o shodné spouštěcí mechanismy (mitochondriální metabolismus regulovaný ATP, kinázová kaskáda aj.) nebo inhibiční faktory (Bcl-2/Bcl-x proteiny). Nicméně hlavním rozdílem mezi těmito dvěma procesy jsou výsledné charakteristiky buněčných pochodů. Zatímco u apoptózy dochází k obalení jednotlivých komponent buňky membránami a následně jsou tyto zlikvidovány makrofágy, u nekrotické buňky dochází k vylití veškerého obsahu cytoplasmy do buněčného okolí a může dojít k zánětu. [83]

Především na volných okrajích ran, kde není tkáň dostatečně zásobena, může docházet k tvorbě nekrotické tkáně. Taková tkáň se poté může šířit do podkoží, kde může dojít až k dehiscenci hlubokých vrstev. Je tedy zcela nezbytné nekrotickou tkáň chirurgicky odstranit často za cenu znovuotevření již hojící se rány. [80]

Gangréna neboli sněť je typem nekrózy, kdy vlivem nedostatečného nebo zcela uzavřeného krevního zásobení dochází k nevratnému odumření tkáně. Postihuje především volné konce končetin. Vzniku gangrény předchází zranění, infekce, poruchy jater, diabetes mellitus, chronické vaskulární onemocnění a jiné příčiny. Rozlišujeme 2 typy gangrény – vlhkou způsobenou bakteriální infekcí a suchou, která vzniká působením vzduchu a je pro ni typická černá tkáň. Tyto dva typy v některé literatuře doplňuje jako třetí typ plynatá gangréna způsobená bakterií *Clostridium perfringens*, která tvoří bublinky plynu. Léčba se provádí odstraněním poškozené tkáně, nebo amputací v případě zasažení prstů či končetin. [84]

## 5.5 Zánět v okolí rány

Zánět je reakce organismu na poškození živé tkáně vyvolané vlivy biologického, mechanického, chemického nebo fyzikálního původu. Mezi typické projevy patří zčervenání postiženého místa, jeho otok, zvýšená teplota a bolestivost. Zánět může být doprovázen vznikem hnisu, který snadno přechází do intersticia, kde je buď neohraničený (takzvaná flegmona), nebo ohraničený (absces). Zánět může být akutní trvající v řádu hodin až dní, ale také chronický s dobou trvání až několik let. [85] Pro léčbu se například využívá sekundárních rostlinných metabolitů, jako je slizovitý gel aloe vera nebo kurkumin, nesteroidní protizánětlivá léčiva na bázi inhibitorů cyklooxygenázy 1 a 2, up nebo down regulace různých typů mikroRNA, které se váží svými 3' konci na mRNA, topickou aplikací insulinu nebo se využívá debridementu za pomoci dezinfikovaných medicínských červů. [86]

## 5.6 Reakce na cizorodý materiál

I přes odstranění cizích těles z rány a její vyčištění, hrozí postoperační komplikace způsobené cizorodým materiálem, který pochází ze stehů. Ačkoli je dnes dostupná celá řada vstřebatelných stehů na bázi syntetických polymerů (vicryl nebo polydioxon), pro určité zákroky je třeba použít nevstřebatelné stehy a to především pro jejich větší pevnost. Ty sice zaručují pevnější spojení protilehlých stran rány, zároveň také u nich hrozí vyšší riziko komplikací hojení, obzvláště u takzvaných ostnatých bezuzlových stehů. [87] Kolem takových stehů, nebo případně i jiných cizích těles, se mohou i několik let po operaci objevit zánětlivé granulomy, takzvané Schlofferovy tumory. [88]

## 5.7 Kontraktury

Jistá míra kontrakce stran rány za pomoci myofibroblastů je zcela žádoucí a důležitá během závěrečné fáze hojení. V některých případech, obzvláště u rozsáhlých popálenin, může dojít k excesivnímu stažení rány a tím dochází k deformaci jejího okolí a často k omezení kloubního pohybu. Nejvíce častým místem vzniku kontraktur bývají dlaně, plosky nohou nebo přední strana hrudníku. [89]

## 6 METODY LÉČBY

Lokální terapie ran zaznamenala v posledních několika dekádách značné změny, z nichž největší význam je přikládán krycím prostředkům, které umožňují takzvaný vlhký způsob hojení ran. Na základě nejnovějších výzkumů jsou farmaceutickým průmyslem dodávány na trh moderní krycí prostředky různého složení, konzistence a vlastností, které zlepšují a urychlují hojení a jsou převážně používány pro hojení chronických ran. [90]

### 6.1 Debridement

Cizí tělesa v ráně představují potenciální vstupní body pro mikroorganismy a omezují proces hojení. Mezi takové tělesa patří například stehy, skleněné střípky, kousky dřeva, ale také nekrotická nebo špatně se hojící tkáň. Je tedy třeba každou ránu důkladně pročistit od veškerých nečistot a neživé tkáně, neboli provést debridement a místo řádně propláchnout. [80] Chirurgické odstranění neživé hmoty je považováno za nejklasičtější přístup, ale jsou i jiné alternativy používané například jako méně invazivní nebo na místech bez přístupu k chirurgickému vybavení.

Mezi takové patří hydrochirurgie, kdy je pro odstranění nečistot a nekrotické tkáně použit proud sterilního tekutého média, který je pod vysokým tlakem směřován paralelně v blízkosti postiženého místa: Díky sníženému tlaku v rychle proudící tekutině (Venturiho efekt) dochází ke strhávání tkáně do proudu tekutiny a k jejímu vyplavení z rány. Tato metoda je poměrně přesná a umožňuje čistit i komplikovaný a členitý povrch rány. [91]

Jako chemický debridement se používají proteolytické enzymy jako je kolagenáza nebo fibrinolysin, které jsou schopny odstranit nekrotickou tkáň. [92] Indikace pro tuto metodu jsou například poruchy srážlivosti krve, kdy klasický chirurgický přístup není žádoucí. [93]

V posledních letech se znovu dostává do popředí v mnoha zemích debridement nekrotické tkáně za pomoci sterilních larev bzučivky zelené (*Lucilia sericata*), známý také pod zkratkou MDT (Maggot Debridement Therapy – terapie debridementem larvami). Tato metoda s relativně vysokým účinkem, která je známá již z období antiky, přináší celou řadu výhod. Kromě nízkých nákladů je přínosem MDT cílení larev pouze na neživou nekrotickou tkáň, což znamená také menší bolestivost zákroku. Larvy nepožírají tkáň přímo, ale vypouští komplex proteolytických enzymů s bakteriocidním a bakteriostatickým účinkem, který přemění nekrotickou tkáň na tekutinu a ta je potom larvami zkonsumována. Snížení bakteriální zátěže také podporuje hojení. [94] Studium extraktu slinných žláz larev *Lucilia seri-*

*cata* bylo zjištěno, že podporuje také uvolnění prozánětlivých faktorů, které jsou pro hojení nezbytné. [95]

## 6.2 Gázové krytí

Gázové krytí se dělí na dva hlavní typy a to na historicky starší tkané, nejčastěji vyráběné ze 100% bavlny, a novější vyrobené z netkané textilie, většinou z viskózy, které má od předešlého typu výhodu v lepším přilnutí k ráně a menší riziko uvolňování žmolků. Vzhledem k tomu, že gáza sama o sobě nemá aktivní léčivé vlastnosti, neudrží ránu v optimální vlhkosti, nachází v dnešní době nejčastěji využití jako sekundární krycí materiál. V případě přímého kontaktu s ránou se využívá její schopnosti odsávání krve a exudátu přímo v dutině rány [96], nebo se může napustit látkami s antimikrobiálním účinkem urychlujícím hojení. [97] Nevýhodou gázového krytí je jeho vyšší přilnavost k ráně a macerace neboli rozmáčení okrajů rány, což vyžaduje častější výměny krycího materiálu, což je méně ekonomické než modernější krycí metody. [98]

## 6.3 Vlhká terapie

Základem úspěšného hojení rány je zajištění odvodu exudátu a zároveň ochrana před vysycháním. Obzvláště u chronických ran bývá porušena ochranná bariéra kůže a dochází ke zvýšení TEWL. Vzhledem k tomu, že voda je zcela zásadní pro správnou funkci kůže a účastní se celé řady procesů během hojení, je důležité udržovat optimální vlhkost rány. [99] Vlhké prostředí zároveň usnadňuje přenos a funkci buněk a enzymů autolytického debridementu (rozklad nekrotické tkáně bílými krvinkami a enzymy) v ráně. [92] Aby se rána zacelila, je třeba migrace epitelových buněk z okrajů ran, což jim vlhké prostředí umožní. Naopak v suché ráně musí tyto buňky cestovat mnohem hlouběji do tkáně, kde je dostatečná vlhkost a proces hojení se tak výrazně prodlouží. Z výše uvedených důvodů se v současné době doporučuje co nejvíce používat vlhké krytí, které zajistí udržení optimální vlhkosti rán, podpoří epiteliální migraci a proliferaci, slouží jako bariéra chránící před sekundární bakteriální kontaminací a zajišťuje absorpci přebytečného exudátu. [100]

V moderní medicíně se stále více používá hydrogelového krytí jako velice nadějně formy vlhké terapie. Hydrogely jsou hydrofilní trojrozměrné sítě polymerů se schopností absorpce značného množství vody nebo jiné tekutiny. Vzhledem k vysoké biokompatibilitě poréznosti a mechanickým vlastnostem mohou simulovat přirozenou živou tkáň a nacházejí tak řadu uplatnění i například jako kontaktní čočky, vehikula léčivých látek, membrány

biosenzorů a jiné. [101] Při aplikacích jako je krytí ran, je výhodou hydrogelů jejich schopnost bioadhezivita, což zvyšuje kožní absorpci účinných látek v hydrogelu rozpustných, nebo mechanické stability, díky které se snadno odstraní z místa rány. [102] Vodivé hydrogely navíc mohou usnadnit mezibuněčnou komunikaci a tím urychlit hojení, obzvláště u hlubokých ran. [103]

Příprava hydrogelů se provádí dvěma způsoby a to buď trojrozměrnou polymerizací hydrofilních monomerů za přítomnosti polyfunkčních síťovacích činidel, nebo přímým síťováním ve vodě rozpustných polymerů. První metoda má však tu nevýhodu, že po sesíťování zůstává v materiálu značné množství volných monomerů, které často mívají toxické vlastnosti a materiál je tak třeba řádně pročistit nebo provést sekundární sesíťování termálními nebo radiačními metodami. Oproti tomu u druhého způsobu přípravy hydrogelů, tedy přímé polymerizace ve vodě rozpustných netoxických polymerů, jakými jsou například poly(akrylová kyselina) - PAA, poly(vinyl pyrrolidon) - PVP, poly(vinyl alkohol) - PVA nebo poly(etylen glykol) - PEG. [104] Je však zapotřebí vyvážit vlastnosti výsledného produktu tak, aby vyhovoval daným potřebám. Hydrogely na bázi biopolymerů mají například špatné mechanické vlastnosti, pokud jsou nabobtnalé a špatně se odstraňují z pokožky. Naproti tomu hydrogely na bázi syntetických polymerů mohou vykazovat jiné nevhodné parametry. Například PVA je málo elastický a má nízkou hydrofilitu. Proto je vhodné využívat hybridních hydrogelů tvořených jedním přírodním a jedním syntetickým polymerem pro maximální optimalizaci výsledných vlastností. [102] Ve spojení s možností aplikace ve spreji a napuštěním bioaktivními látkami se z hydrogelů stává velice perspektivní krycí materiál. [105]

## 6.4 Kompresní terapie

Na dolní končetině rozlišujeme žíly povrchové a hluboké, které jsou propojeny četnými spojkami a jsou opatřeny chlopněmi, které brání v zpětném krevním toku. Za fyziologických podmínek je krev odváděna z povrchových žil do žil hlubokých, avšak s přibývajícím věkem dochází k insuficienci žilních chlopní a krev proudí z hlubokých žil zpět do povrchových, které se přepřňují a dávají tak vzniknout takzvaným varixům neboli křečovým žilám. Pokud je krevní tlak varixů dlouhotrvající, může kůže nad nimi nekrotizovat a dochází ke vzniku bércového vředu. [106] Za pomoci kompresní léčby je možné zvrátit tento průběh navozením umělé svalové pumpy, která žene krev správným směrem z povrchu do vnitřního žilního systému. Jako kompresní materiál se používají gradientní kompresní pun-



čochy, elastická obinadla nebo kompresní pumpy, případně jejich vhodná kombinace. [107]

## 6.5 Podtlaková terapie

Relativně novou metodou podporující hojení ran je podtlaková terapie, známá také pod zkratkou TNP (Topical Negative Pressure = lokální podtlak), která za pomoci sníženého tlaku v utěsněném krytí odsává z rány přebytečnou tekutinu a za pomoci systému hadiček ji odvádí do sběrného kontejneru. Používá se jako podpůrný prostředek během léčby chronických a komplikovaných ran, nebo jako doplňková metoda během přípravy rány pro kožní štěp. I když doposud není zcela jednotný názor na způsob účinku této metody, má se za to, že NTP využívá 3 efektů. Je to jednak extracelulární účinek, jakým je zvýšení průtoku krve a snížení otoku, dále účinek na buněčné úrovni, kterým je podpora tvorby granulární tkáně a komplexní efekt, kdy dochází ke snížení bakteriální zátěže a zvýšení propustnosti buněk imunitního systému skrze cévy, což se ukázalo jako poměrně účinné například u pacientů s popáleninami. Je však potřeba dalších studií, které by lépe objasnili veškeré účinky této metody, aby se mohla více uplatnit v praxi. [108]

## 6.6 Další metody krytí ran

K výše uvedeným způsobům léčby ran existuje celá řada dalších více či méně používaných metod. Jednou z takových poměrně zajímavějších je aplikace včelího medu přímo na ránu. Med je využíván k léčebným účelům už po staletí a jeho biologické účinky jsou zejména přisuzovány přítomnosti flavonoidů a fenolických kyselin. Z pohledu léčby ran je důležitá přítomnost peroxidu vodíku, vysoká osmolalita, kyselost, fenoly a oxid dusnatý. Jako krycí materiál podporuje autolytický debridement, tvorbu vaziva a angiogenezi v ráně. [109]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 7 CÍL PRÁCE

Cílem této práce byla příprava materiálů využitelných pro podporu hojení ran a stanovení jejich biologických vlastností. Konkrétně se jednalo o přípravu hydrogelů připravených síťováním PVA za pomoci DAC. Testována byla cytotoxicita čistých hydrogelů a dále účinek hydrogelů napuštěných aktivními látkami rutinem a askorbyl fosfátem sodným na buněčnou proliferaci a mobilitu simulující *in vitro* hojení ran.

## 8 METODA PŘÍPRAVY HYDROGELŮ PVA/DAC A KULTIVACE BUNĚČNÉ LINIE

Kromě přípravy čistých a nasycených hydrogelů aktivními látkami bylo potřeba také nakultivovat buněčnou linii pro sledování jejich cytotoxicity pomocí MTT testu.

### 8.1 Použité materiály

Pro syntézu byl použit poly(vinyl alkohol) (PVA) se stupněm hydrolyzy 88% a molární hmotností  $M_{w1} = 130$  kDa.

Pro syntézu 2,3-dialdehydcelulózy (DAC) a následnou přípravu hydrogelů byla použita  $\alpha$ -celulóza  $M_w = 109$  kDa (Sigma Aldrich Co.), jodistan sodný ( $\text{NaIO}_4$ , Penta, Česká republika), ethylenglykol, kyselina chlorovodíková (Penta, Česká republika)

Připravované PVA/DAC hydrogely byly napuštěny rutinem a SAP neboli askorbyl fosfátem sodným (Sigma Aldrich Co.) Výběr rutinu a SAP pro tuto aplikaci byl proveden na základě výsledků studií, které prokázaly pozitivní účinky na hojení ran při topickém použití hydrogelů napuštěných právě těmito látkami. [110] [111] [112]

Pro sledování biologických vlastností byla použita myší buněčná linie embryonálních fibroblastů NIH/3T3, ECACC. Jako kultivační médium bylo použito DMEM s přidavkem fetálního telecího séra (Biosera, Francie) a 100 U/ml Penicilin/Streptomycin (Biosera, Francie).

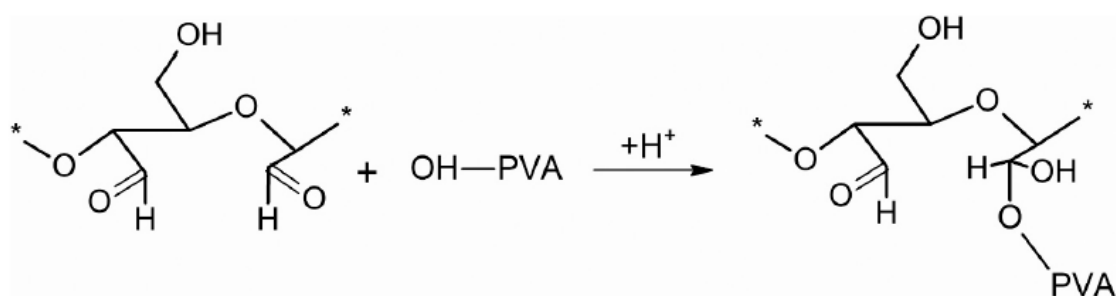
Buňky byly inkubovány při 37 °C za stálé vysoké vlhkosti o 5% koncentraci  $\text{CO}_2$  v inkubátoru HeraCell 150i. K oplachu buněk byl použit fosfátový pufr (PBS, Invitrogen, USA). Buňky byly kultivovány na kultivačních destičkách (TPP, Švýcarsko).

Pro biologické testování byl dále použit MTT test (MTT cell proliferation assay, Duchefa Biochemistry, Nizozemí), ultračistá voda a dimethylsulfoxid (Pentachemicals, Česká republika). Všechny výše uvedené látky byly analytické čistoty a nebyly dále nijak čištěny.

### 8.2 Příprava PVA/DAC hydrogelů

Příprava DAC probíhala oxidací  $\alpha$ -celulózy jodistanem sodným v molárním poměru 1:1,2 (DAC: $\text{NaIO}_4$ ). 10 g celulózy bylo dispergováno v 250 ml vody s přidavkem 16,5 g  $\text{NaIO}_4$  a tato směs byla poté míchána po dobu 72 h při 30 °C bez přístupu světla. Oxidace byla ukončena přidavkem 10 ml ethylenglykolu, produkt byl promyt a přefiltrován. Vzniklá

DAC byla rozpuštěna ve 175 ml vody a solubilizována po dobu 7 h při teplotě 80 °C. [113] V následujícím kroku byla solubilizovaná DAC zchlazena, centrifugována po dobu 10 minut při 10000 rpm a roztok byl přemístěn do odměrné baňky o objemu 200 ml. Hmotnostní koncentrace solubilizované DAC byla hmotnostní analýzou stanovena na  $42,3 \pm 1,3$  mg/ml. Takto připravená DAC o známé koncentraci byla následně použita k síťování PVA. V následujícím kroku bylo 10 g PVA rozpuštěno v 80 ml vody a zahříváno při 90 °C až do rozpuštění. Dále byl přidán katalyzátor (kyselina chlorovodíková, 10 ml 1,3 M) a definované množství DAC odpovídající 0,25 % a 1 % hmotnosti PVA. Reakční směsi byly následně řádně promíchány, nality na Petriho misky (průměr 140 mm) a sušeny při teplotě 30 °C do konstantní hmotnosti. Během tohoto schnutí probíhá síťovací reakce DAC s PVA, při které dehydratací  $-CHO$  skupin DAC vznikají hemiacetaly s hydroxylovými skupinami PVA.



Obrázek číslo 1 – zjednodušené schéma reakce  $-CHO$  skupiny DAC s hydroxylovou skupinou PVA v kyselém prostředí [102]

Takto připravené tenké vrstvy hydrogelů byly řádně propláchnuty ve vodě, aby se nesíťovaný materiál odplavil. Poté byly z těchto vrstev vyřezány disky o průměru 15 a 50 mm a uskladněny v 70% etanolu, aby se předešlo biologické kontaminaci. Přehled vzorků je zpracován v tabulce č. 1.

Vzorek	PVA (g)	Mw PVA (kDa)	DAC (hm%)	DAC (g)
A025	10	130	0,25	0,025
A100	10	130	1	0,1

Tabulka 1 - Přehled vzorků PVA/DAC

### 8.3 Napuštění a uvolňování hydrogelů

K analýze scratch assay byl vzorek A025 ( $d=50$  mm) napuštěn rutinem a SAP. Vzorek A025 byl ponořen do 50 ml roztoku rutinu o koncentraci 0,1 mg/ml a protřepáván po dobu 72 h při teplotě 37 °C. Obdobně byl připraven vzorek napuštěný SAP, koncentrace roztoku ale byla 0,128 mg/ml. Aby bylo možné zjistit celkové množství látky v hydrogelu, byla napřed stanovena tzv. gelová frakce, tj. kolik pevné látky obsahuje daný materiál jeho vysušením a zvážením. Bylo zjištěno, že hydrogel A025 obsahoval 98.5% vody. Vzorky hydrogelu A025 o průměrné hmotnosti 2,168 g po napuštění roztokem rutinu obsahovaly celkem 0,21 mg rutinu. Podobně vzorky gelu napuštěného SAP obsahovaly 0,3 mg této látky.

### 8.4 Kultivace buněčné linie

Kultivace buněčné linie NIH/3T3 probíhala v biologickém inkubátoru v kultivačních nádobách (TPP, Švýcarsko), následné pasážování probíhalo v laminárním boxu s řízenou cirkulací vzduchu Herasafe KSP (Thermoscientific, USA). Kultivační médium nad kultivovanými buňkami bylo odsáto a do kultivační nádoby bylo přidáno 15 ml fosfátového pufru PBS, kterým se odstranily zbytky kultivačního média. Pufra PBS byl poté odsát a do kultivační nádoby se přidalo 7,5 ml trypsinu, který zde byl ponechán po dobu 10 minut, aby se naadherované buňky enzymaticky oddělily od stěn kultivační nádoby. Oddělení buněk bylo potvrzeno pozorováním pomocí invertovaného světelného mikroskopu s fázovým kontrastem (Olympus XI 81, Japonsko). Poté bylo k buňkám přidáno 7,5 ml kultivačního média a tento roztok byl přenesen do centrifugační zkumavky, která byla vložena do vyhřáté centrifugy na 3 minuty při 1100 rpm. Odstředěný roztok byl poté odsát a k sedimentu buněk ve zkumavce bylo přidáno médium pro dosažení požadované koncentrace a buněčná suspenze byla pečlivě zhomogenizována.

## 9 TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ HYDROGELŮ

Cytotoxické vlastnosti hydrogelů byly stanoveny podle normy ISO 10993 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků a to dle části 5: Zkouška na cytotoxicitu *in vitro* (ČSN EN ISO 10993-5). Vzorky byly připraveny dle části 12: Příprava vzorků a referenční materiály (ČSN EN ISO 10993-12). Cytotoxicita byla testována oběma způsoby uvedenými v této ISO normě, tedy stanovení cytotoxicity extraktem a přímým kontaktem.

Testování pomocí scratch assay probíhalo dle protokolu z časopisu Nature (2007, Chun-Chi LIANG, Ann Y PARK & Jun-Lin GUAN). [114]

### 9.1 Stanovení cytotoxicity extraktem

Extrakt pro stanovení cytotoxicity byl připraven dle ČSN EN ISO 10993-12 na základě níže uvedené tabulky převzaté z této ISO normy. Pro hydrogel s porézní strukturou byl extrakční poměr stanoven na 0,1 g/ml kultivačního média.

Tloušťka materiálu [mm]	Extrakční poměr (povrchová plocha nebo hmotnost/objem) $\pm 10\%$	Formy materiálu
<0,5	$6 \text{ cm}^2 \cdot \text{ml}^{-1}$	Film, fólie, trubičky
0,5 – 1,0	$3 \text{ cm}^2 \cdot \text{ml}^{-1}$	Trubičky, desky, malé tvarované předměty
>1,0	$3 \text{ cm}^2 \cdot \text{ml}^{-1}$	Větší tvarované předměty
>1,0	$1,25 \text{ cm}^2 \cdot \text{ml}^{-1}$	Elastomerní uzávěry
Nepřavidelně tvarovaná pevná forma	$0,2 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Prášek, granule, pěny, neabsorpční tvarované předměty
Nepřavidelně tvarovaná porézní forma (materiály s nízkou hustotou)	$0,1 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Membrány, textil

Tabulka 2 – Přehled extrakčních poměrů vzhledem k použitému materiálu

V následujícím kroku byly již zpasážované buňky nasazeny v koncentraci  $1 \times 10^5$  buněk na 1 ml média do 96 mikrotitračních destiček. Takto připravené buňky se nechaly adherovat na povrch mikrotitračních destiček po dobu 24 hodin. Hydrogely byly nastříhány, naváženy a vloženy do kultivačního média, aby extrakt z připravených hydrogelů byl připra-

ven na extrakční poměr 0,1 g vzorku na 1 ml kultivačního média. Za konstantního třepání při teplotě 37 °C po dobu 24 h byl vytvořen finální extrakt. Takto připravený finální extrakt byl poté přidán v různých koncentracích (50%, 75% a 100%) k překultivovaným buňkám v mikrotitračních destičkách a extrakty se dle normy nechaly působit na buňky po dobu 24 hodin. Po uplynutí doby expozice byly buňky v destičkách zkontrolovány pomocí mikroskopu a cytotoxicita stanovena MTT testem. Jako reference byly použity buňky kultivované v čistém médiu bez přidaného extraktu.

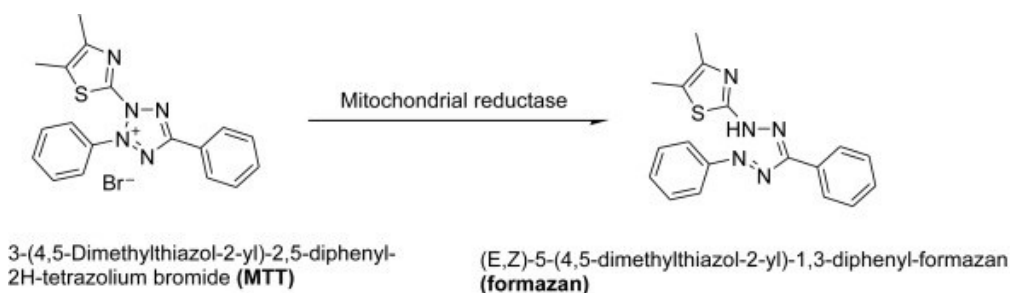
## 9.2 Stanovení cytotoxicity přímým kontaktem

Stejně jako u testování cytotoxicity extraktem, tak i metodou přímého kontaktu byly buňky nasazeny k překultivování v koncentraci  $1 \times 10^5$  buněk na 1 ml média do mikrotitračních destiček a ponechaly se kultivovat po dobu 24 h. Pro toto testování byly zvoleny větší destičky a to 24 jamkové z důvodu lepšího pozorování chování buněk. Poté byly hydrogely vloženy do středů jamek a nechaly se působit po dobu 72 h na rostoucí buňky. Během celé doby kultivace byly buňky pravidelně vizuálně kontrolovány pod mikroskopem. Po takto dlouhé době dosáhla referenční miska (bez hydrogelu) konfluence, tedy buňky prorostly celý povrch destičky. I zde byla cytotoxicita stanovena pomocí MTT testu.

## 9.3 MTT test

Pomocí MTT testu lze vyhodnotit metabolickou aktivitu buněk a na principu schopnosti živé buňky přeměny konkrétního substrátu na produkt s jiným zbarvením, kdy barevnou změnu lze měřit spektrofotometricky. K tomuto účelu se používá látka označovaná jako MTT neboli 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid, která je metabolicky aktivními buňkami přeměněna na krystaly formazanu (obrázek 2, [115]). MTT je žlutá látka a při jeho redukci na formazanu dochází ke změně zbarvení na modrou až sytě fialovou. Vznikající formazan je nerozpustný ve vodních roztocích a proto je nutné jej k vyhodnocení rozpustit organickým rozpouštědlem a to dimethylsulfoxidem.





Obrázek 2 – redukce MTT na formazan [115]

Jak u testu cytotoxicity extraktem, tak přímým kontaktem, bylo z mikrotitračních destiček odstraněny testované vzorky a místo nich bylo napipetováno MTT o koncentraci 0,5 mg/ml a ponecháno reagovat po dobu 4 hodin. Po 4 hodinách bylo MTT odsáto a místo něj byl k buňkám přidán dimethylsulfoxid (DMSO), jehož úkolem bylo rozpustit případně vzniklé krystaly formazanu. Po 15 minutách působení DMSO byla změřena absorbance při vlnové délce 570 nm (referenční vlnová délka 690 nm). Jako reference byly použity buňky kultivované v čistém médiu bez extraktu nebo vzorku hydrogelu a jejich životaschopnost byla stanovena na hodnotu 1, tedy 100% životaschopnost.

#### 9.4 Scratch assay

Scratch assay je poměrně nenáročná a finančně dostupná metoda měření *in vitro* buněčné migrace. Jejím principem je vytvoření konfluentní buněčné monovrstvy, do které se vhodným nástrojem vytvoří rýha, která může například simulovat poranění pokožky. Od této chvíle se rýha pozoruje a zaznamenává její zacelení proliferací a migrací buněk, jejichž chování je velice podobné tomu *in vivo* během hojení. Jednou z dalších výhod scratch assay je totiž její kompatibilita s mikroskopickým pozorováním a možnost snadného snímkování. Celý proces do zacelení trvá přibližně 8-18 h v závislosti na velikosti rýhy a podmínkách, jako je například aplikace účinné látky. [114]

Testování pomocí scratch assay probíhalo dle protokolu z časopisu Nature (2007, Chun-Chi LIANG, Ann Y PARK & Jun-Lin GUAN). Nejprve bylo vytvořeno vhodné prostředí pro kultivaci buněk. Na Petriho misku o průměru 60 mm byla nasazena buněčná suspenze o koncentraci  $1 \times 10^5$  buněk na 1 ml kultivačního média. Důležitým aspektem bylo důkladné zhomogenizování buněčné suspenze, aby následně vznikla rovnoměrná monovrstva.

Misky byly následně kultivovány při teplotě 37 °C do plné konfluence.

Do každé z takto připravených monovrstev byla udělána jedna rovná rýha za pomoci pipetovací špičky p200. V těsné blízkosti každé z rýhy byl pro účely snímkování vyznačen referenční bod. Zásadním krokem v tomto postupu bylo vytvoření rýh stejně širokých pro optimální porovnávání výsledků. V tento moment se provedla první fotografie v čase  $t_0$ .

Na všechny misky kromě referenční byly poté aplikovány buď samotné účinné látky, nebo hydrogely napuštěné těmito účinnými látkami. Jako účinné látky mající vliv na hojení ran byly vybrány rutin a SAP (viz. kapitola 8.1). Koncentrace samotné látky a látky obsažené ve vzorku byly stejné. V případě rutinu byla výsledná použitá koncentrace 0,21 mg a v případě SAP 0,3 mg. Misky byly sledovány a mikrosnímkovány po 6 ( $t_6$ ) a 24 h ( $t_{24}$ ) v místech poblíž referenčního bodu a výsledná rýha byla poté porovnána s rýhou v čase  $t_0$ .

Veškeré měření bylo pro kontrolu provedeno dvojitě.

## 10 VÝSLEDKY A DISKUZE

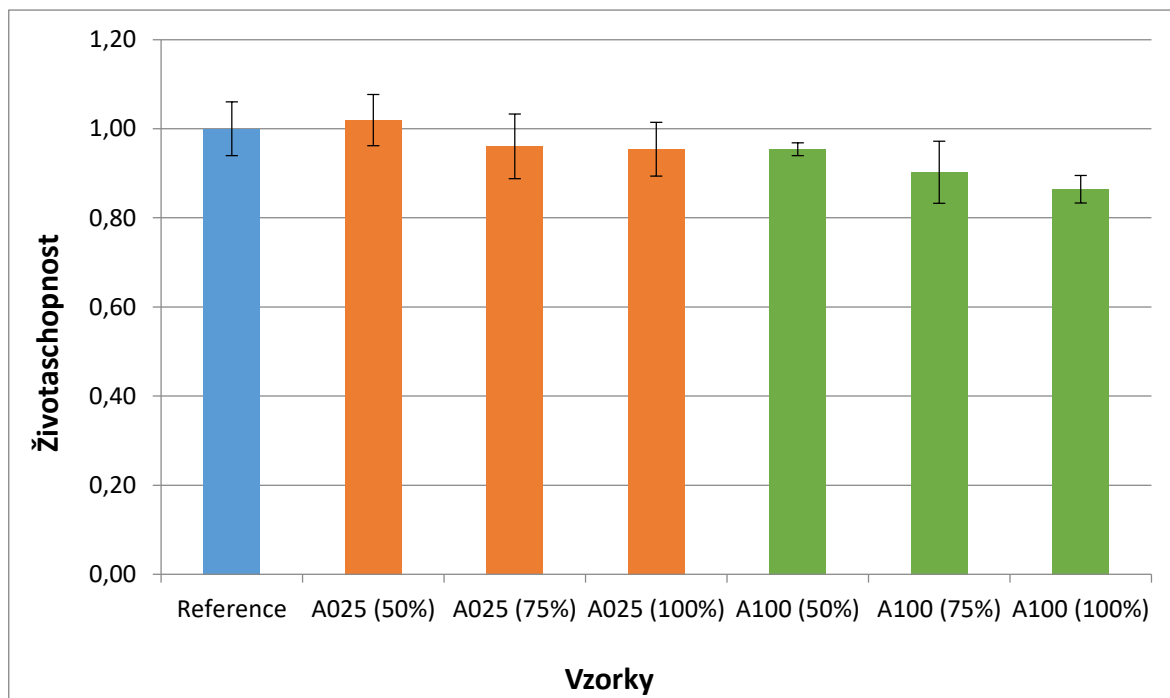
Byly připraveny celkem 2 typy hydrogelů lišící se molární hmotností PVA a množstvím DAC, které byly následně podrobeny biologickým zkouškám cytotoxicity pomocí MTT testu. Hydrogel vykazující lepší cytotokompatibilitu byl napuštěn účinnými léčivými látkami a byl testován na buněčnou proliferaci a mobilitu pomocí scratch assay.

### 10.1 Test cytotoxicity

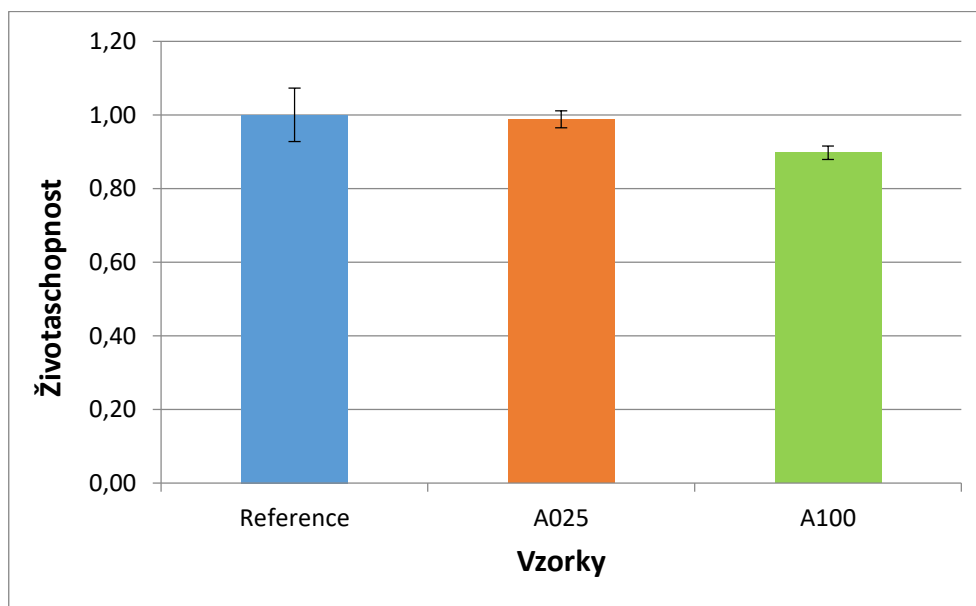
Cytotoxicita samotných hydrogelů byla změřena dle ČSN EN ISO 10993-5, absorbance referenčního vzorku byla nastavena na hodnotu 1, tedy 100% viabilitu. Norma mimo jiné také určuje míru cytotoxicity dle následující tabulky.

Životoschopnost	Úroveň cytotoxicity
> 0,8	Bez efektu cytotoxicity
0,6 – 0,8	Mírně cytotoxický efekt
0,4 – 0,6	Středně cytotoxický efekt
< 0,4	Silně cytotoxický efekt

*Tabulka 3 – přehled životoschopnosti buněk s odpovídajícím stupněm cytotoxicity dle ISO 10993*

**Výsledky stanovení cytotoxicity extraktem**

*Graf 1 – Životaschopnost buněk při kontaktu s extrakty hydrogelů v různých koncentracích. Doba působení extraktu byla 24 hodin.*

**Výsledky stanovení cytotoxicity přímým kontaktem**

*Graf 2 - Životaschopnost buněk při přímém kontaktu s hydrogely. Doba kontaktu byla 72 hodin.*

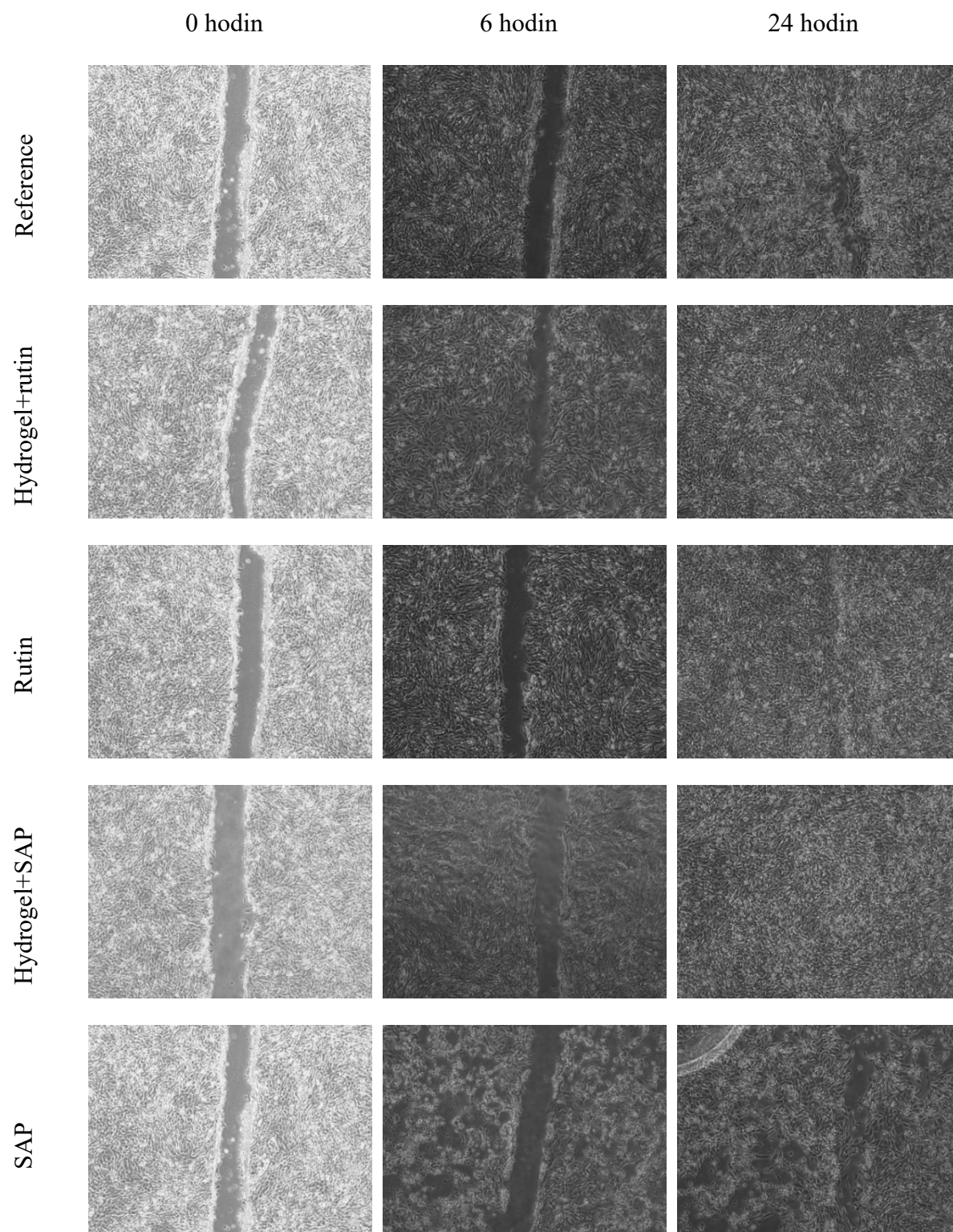
Při přípravě materiálů využívaných v kontaktu s živými tkáněmi je nutné dbát na biokompatibilitu tohoto materiálu, Základním parametrem biokompatibility je cytotoxicita materiálu. Ať už se materiál využívá jako implantát, přichází do kontaktu s povrchem těla nebo se jedná o externě komunikující zařízení, ISO norma udává, že je nutné stanovit cytotoxicitu tohoto materiálu. Stanovení cytotoxicity je proto vždy prvním krokem při charakterizaci biologických vlastností biomateriálu.

Cytotoxicita připravených hydrogelů určených pro topické aplikace byla stanovena dvěma způsoby, přičemž oba dva postupy byly testované podle ISO normy. Jednalo se o cytotoxicitu extraktů z hydrogelů a cytotoxicitu v přímém styku se vzorky.

V případě stanovení cytotoxicity z extraktů byly buňky vystavené působení extraktů po dobu 24 hodin, zatímco při testování v přímém kontaktu byl materiál exponovaný na buněčnou linii až po dobu 72 hodin. Výsledky těchto testování jsou uvedeny v grafu číslo 1 a 2.

Z výše uvedených grafů lze určit, že oba vzorky A025 i A100 byly necytotoxické, neboť příložená tabulka dle ISO normy 10993 stanoví hranici cytotoxicity nad 80 % životaschopnosti. Cytotoxický účinek se neprojevil ani při nejvyšší testované koncentraci extraktů a zároveň ani při jednom postupu testování. Proto je možné konstatovat, že oba vzorky jsou tedy vhodné pro topickou aplikaci s tím, že A025 vyšel o něco málo lépe. Proto byl tento vzorek podroben dalšímu testování v podobě scratch assay.

## 10.2 Výsledky scratch assay



Obrázek 3 – Mikrofotografie ze scratch testu simulujícího hojení ran.

Výsledky tohoto testu shrnuje výše uvedená sada pořízených mikrosnímků v časovém rozmezí  $t_0$ ,  $t_6$  a  $t_{24}$  pro jednotlivé misky s referencí, s hydrogelem napuštěným rutinem, se samotným rutinem, s hydrogelem napuštěným SAP a se samotným SAP.

V případě samotného rutinu můžeme pozorovat i po 24 h místo, kde byla původně vytvořena rýha, avšak při aplikaci hydrogelu napuštěného rutinem již není rýha vidět. Podobný jev lze pozorovat i u SAP a hydrogel + SAP. Zde je však rozdíl v tom, že buňky začaly po aplikaci samotného SAP vykazovat po 6 h morfologické změny a změnu proliferace. Po 24 h se však jejich celkový stav zlepšil, ale i tak nedošlo k úplnému zacelení rýhy. Naproti tomu na snímcích, kde byl aplikován na rýhu hydrogel napuštěný SAP, lze pozorovat úplné zacelení rýhy. Tento jev byl nejspíše způsoben tím, že SAP v této koncentraci vykazoval mírné cytotoxické účinky, avšak ty nebyly natolik markantní při postupném uvolňování z hydrogelu. Vzhledem k tomu, že rýhu lze pozorovat na referenčním vzorku ještě i po 24 hodinách, můžeme konstatovat, že nejrychlejší hojení probíhalo při použití hydrogelů napuštěných aktivními látkami rutinem nebo SAP.

Bohužel výsledek tohoto testu není příliš průkazný, protože vzhledem k tomu, že buňky rostly příliš rychle, nebylo možné zaznamenat rozdíly mezi jednotlivými vzorky. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto, že bude test proveden zcela znovu, což se bohužel kvůli zhoršení pandemické situace Covid-19 a uzavření univerzity nepodařilo.

## ZÁVĚR

Teoretická část práce byla věnována literární rešerši tematicky zaměřené na kůži a hojení ran. Nejprve byla popsána stavba kůže s důrazem na vybrané komponenty, které se účastní složitého procesu hojení. Po kapitole věnující se nejčastějším typům ran, příčinám vzniku a jejich základní charakteristice, následovala kapitola zabývající se kaskádou biologických a biochemických pochodů, které zajišťují, že se rána správně zahojí. V návaznosti na tento proces pojednávaly následující kapitoly o možných pozitivních i negativních faktorech ovlivňujících hojení a běžných komplikacích, které hojení mohou znesnadnit. Poslední kapitola popisovala v současné době nejběžněji používané metody léčení ran, i několik vybraných méně obvyklých, které jsou teprve na vzestupu nebo jejich aplikace vyžaduje zvláštní okolnosti.

Experimentální část této diplomové práce se zaměřila na přípravu hydrogelů a jejich biologické testování pro možnou aplikaci jako krycí materiál aplikovatelný na rány. Pro přípravu těchto hydrogelů byl zvolen polymer polyvinylalkohol (PAC), který byl zesíťovaný pomocí 2,3-dialdehydcelulózy (DAC) o dvou různých koncentracích. Takto byly připraveny dva vzorky hydrogelů, vzorek A025 a A100. Vzhledem k tomu, že zamýšlené využití hydrogelů je spojené s hojením ran, s čímž se váže jejich aplikace přímo na lidskou pokožku, je velmi důležité, aby tyto hydrogely nevykazovaly žádný cytotoxický účinek. Proto byly připravené vzorky následně podrobeny biologickému testování. Provedlo se hodnocení cytotoxicity dle ČSN EN ISO 10993. Testování proběhlo za využití buněčné linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 a na stanovení cytotoxického účinku byl použit test MTT. Nejdříve byly z obou hydrogelů vytvořeny extrakty, které byly aplikovány na myší fibroblasty o koncentracích 50 %, 75 % a 100 %. Zároveň byly na myší fibroblasty aplikovány samotné hydrogely, což znamená, že test cytotoxicity probíhal v přímém kontaktu. Výsledná životaschopnost testovaných buněk byla jak po aplikaci extraktů, tak po přímém kontaktu s hydrogely stanovena nad 80 %, z čehož dle výše uvedené ISO normy vyplývá, že připravené hydrogely nevykazují žádný cytotoxický účinek.

Při hojení ran je velmi podstatné jejich zacelení. Takové zacelení je možné sledovat *in vitro* s využitím buněčných kultur pomocí tzv. scratch assay. Pro zkoušku scratch assay sledující mobilitu buněk *in vitro*, byly hydrogely napuštěny bioaktivními látkami podporujícími hojení ran a to rutinem a askorbyl fosfátem sodným (SAP). Rána je v případě scratch testu simulována rýhou, která je vytvořena na konfluentní buněčné monovrstvě pomocí



špičky mikropipety. Na každou takto připravenou rýhu byl aplikován jiný preparát: hydrogel napuštěný rutinem, hydrogel napuštěný SAP, samotný rutin a samotný SAP. Zároveň byla připravena i referenční rýha, kde nebyla aplikována žádná látka. Pozorováním rychlosti zacelení rýhy se ukázaly napuštěné hydrogely jako neúčinnější, nicméně buněčná linie zarůstala rýhu příliš rychle a tedy průkaznost celého testu nebyla příliš vysoká, avšak z důvodu zhoršení pandemické situace nebylo možné zkoušku zopakovat. V rámci diplomové práce bylo také plánováno sledování transdermální absorpce z připravených hydrogelů. Bohužel ani tento test nebylo možné dokončit kvůli pandemické situaci.

Závěrem je i tak možné z předložených výsledků cytotoxicity i scratch assay usoudit, že připravené hydrogely byly bezpečné a vhodné jako materiály pro krytí ran.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1]. **HUDÁK, Radovan.** *Memorix histologie*. Praha : TRITON, 2016. str. 441. ISBN: 978-80-7553-009-7.
- [2]. **MORRISON, India, Line S. LÖKEN, Håkan OLAUSSON.** The skin as a social organ. *Experimental brain research*. 3, 2010, 204, stránky 305-314. doi: 10.1007/s00221-009-2007-y.
- [3]. **MESCHER, Anthony L.** *Junqueira's Basic Histology, text and atlas*. 15. New York : McGraw-Hill Education, 2018. str. 372. ISBN: 978-1-26-002618-4.
- [4]. **HALPRIN, Kenneth M.** Epidermal "turnover time" - a re-examination. *British Journal of Dermatology*. 86, 1972, 1, stránky 14-19. doi: 10.1111/j.1365-2133.1972.tb01886.x.
- [5]. **WATT, Fiona M.** The stem cell compartment in human interfollicular epidermis. *Journal of Dermatological Science*. 28, 2002, 3, stránky 173-180. doi:10.1016/S0923-1811(02)00003-8.
- [6]. **RILEY, P.A.** Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1997, 11, stránky 1235-1239. doi: 10.1016/S1357-2725(97)00013-7.
- [7]. **BRENNER, Michaela, Vincent J. HEARING.** The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochem Photobiol.* 3, 2008, 84, stránky 539-549. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x.
- [8]. **GRIFFITHS, Christopher E.M.et al.** *Rook's Textbook of Dermatology*. online edice. Chichester : John Wiley & Sons, Ltd, 2016. stránky 49-50. ISBN: 9781118441190.
- [9]. **MORRISON, Kristin M.et al.** Mammalian Merkel cells are descendent from the epidermal lineage. *Developmental Biology*. 2009, Sv. 1, 336, stránky 76-83. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.09.032.
- [10]. **LEE, Rim You et al.** A flexible artificial intrinsic-synaptic tactile sensory organ. *Nature Communications*. 11, 2020, 2753. doi: 10.1038/s41467-020-16606-w.
- [11]. **GARROD, David, Martyn CHIDGEY.** Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008, Sv. 1778, 3, stránky 572-587. doi:10.1016/j.bbamem.2007.07.014.

- [12]. **WALKO, Gernot, Maria J. CASTANÓN, Gerhard WICHE.** Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res.* 360, 2015, 2, str. 363. doi: 10.1007/s00441-014-2061-z.
- [13]. **ALIBARDI, Lorenzo.** Adaptation to the Land: The Skin of Reptiles in Comparison to That of Amphibians and Endotherm Amniotes. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)*. 2003, Sv. 298B, 1, stránky 12-41.
- [14]. **WALLOE, Lars.** Arterio-venous anastomoses in the human skin and their role in temperature control. *Temperature.* 3, 2016, 1, stránky 92-103. doi: 10.1080/23328940.2015.1088502.
- [15]. **BARBIERI, J.S., K. WANAT, J. SEYKORA.** Skin: Basic Structure and Function. 2014, 1, stránky 1134-1144. doi: 10.1016/B978-0-12-386456-7.03501-2.
- [16]. **LICHNOVSKÝ, Václav et al.** *Repetitorium histologie*. 3. Olomouc : Univerzita Palackého, Lékařská fakulta, 2000. ISBN 80-244-0221-1.
- [17]. **ELIAS, M. Peter, Kenneth R. FEINGOLD.** *Skin Barrier*. New York : Taylor & Francis Group, LLC, 2006. ISBN-10: 0824758153.
- [18]. **BOUWSTRA, Joke A. et al.** Structural Investigations of Human Stratum Corneum by Small-Angle X-Ray Scattering. *J. Invest. Dermatol.* 1991, 96, stránky 1006-1014.
- [19]. **WEERHEIM, A., M. PONEC.** Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch Dermatol Res.* 293, 2001, 4, stránky 191-199. doi: 10.1007/s004030100212.
- [20]. **MATTER, Karl, Maria S. BALDA.** Occludin and the Functions of Tight Junctions. *International Review of Cytology.* 1998, 186, stránky 117-146. doi: 10.1016/S0074-7696(08)61052-9.
- [21]. **KEZIC, Sanja, Ivone JAKASA.** Filaggrin and Skin Barrier Function. *Curr Probl Dermatol.* 2016, Sv. 49, stránky 1-7. doi: 10.1159/000441539.
- [22]. **RAWLINGS, A., V., C.R. HARDING.** Moisturization and skin barrier function. *Dermatologic Therapy.* 2004, Sv. 17, stránky 43-48. doi: 10.1111/j.1396-0296.2004.04s1005.x.

- [23]. **FRYKBERG, Robert, Jaminelli BANKS.** Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advanced Wound Care (New Rochelle)*. 1, 2015, Sv. 4, 9, stránky 560-582. doi: 10.1089/wound.2015.0635.
- [24]. **YOTSU, R. Rie et al.** Case series of patients with chronic foot ulcers treated with autologous platelet-rich plasma. *The Journal of Dermatology*. 2015, Sv. 42, 3, stránky 288-295. doi:10.1111/1346-8138.12777.
- [25]. **HOOGSTRATEN-MILLER, Shelley, Patricia A. BROWN.** Techniques in Aseptic Rodent Surgery. *Current protocols in immunology*. 82, 2008. 10.1002/0471142735.im0112s82.
- [26]. **BOWLER, Philip.** The Microbiology of Acute and Chronic Wounds. *Wounds: a Compendium of Clinical Research and Practice*. 11, 1999, 4, stránky 72-78.
- [27]. **LIGLE, Lothar et al.** Why do veins appear blue? A new look at an old question. *Applied Optics*. 7, 1996, 35, stránky 1151-1160.
- [28]. **URAKOV, Alexandr et al.** Current and emerging methods for treatment of hemoglobin related cutaneous discoloration: A literature review. *Heliyon*. 2021, Sv. 7, 1. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e05954.
- [29]. **ŠTEFAN, Jiří, Jiří HLADÍK, Tomáš ADÁMEK.** *Soudní lékařství a zdravotnicko-právní otázky*. místo neznámé : e-vydání, 2009.
- [30]. **KARY, M. Joel.** Diagnosis and management of quadriceps strains and contusions. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2010, 3, stránky 26-31. doi: 10.1007/s12178-010-9064-5.
- [31]. **STAINSBY, Brynne, Steven L. PIPER, Robert GRINMUTH.** Management approaches to acute muscular strain and hematoma in National level soccer players: a report of two cases. *The Journal of the Canadian Chiropractic Association*. 2012, Sv. 56, 4, stránky 262-268.
- [32]. **MANISCALO, Kenneth, Mary Ann EDENS.** *Animal Bites*. Treasure Island : StatPearls Publishing, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430852/>.
- [33]. **VELLEMA, Jeanine, Hendrik SCHOLTZ.** Forensic Aspects of Ballistic Injury. *Ballistic Trauma*. 2017, stránky 409-435. doi: 10.1007/978-3-319-61364-2\_26.

- [34]. **DiMAIO, J.M., Vincent.** *Gunshot Wounds: Practical Aspects of Firearms, Ballistics, and Forensic Techniques*. 3. Boca Raton : CRC Press, 2016. ISBN-13:978-1-4987-2570-5.
- [35]. **SHRESTHA, Rijen, Tanuj KANCHAN, Kewal KRISHAN.** Gunshot Wounds Forensic Pathology. *StatPearls [Internet]*. 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556119/>.
- [36]. **ENOCH, Stuart, David John LEAPER.** Basic science of wound healing. *Surgery*. 2008, Sv. 26, 2, stránky 31-37. doi: 10.1016/j.mpsur.2007.11.005.
- [37]. **MARTIN, Mary.** Physiology of Wound Healing. 2013, 1.
- [38]. **SCHWAB, Manfred.** *Encyclopedia of Cancer*. 3. Berlin : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. stránky 1819-1820. ISBN 978-3-642-16483-5.
- [39]. **MARIEB, Elaine, Katja N. HOEHN.** *Human Anatomy & Physiology*. 11. New Jersey : Pearson, 2019. ISBN 13: 978-0-13-458099-9.
- [40]. **GABRIEL, A., Richard.** *Man and Wound in the Ancient World*. 1. vydání (elektronické). Dulles : Potomac Books, Inc., 2012. ISBN 978-1-59797-849-1.
- [41]. **MARKIEWSKI, M. MAXIEJ, John D. LAMBRIS.** The Role of Complement in Inflammatory Diseases From Behind the Scenes into the Spotlight. *The American Journal of Pathology*. 2007, Sv. 171, 3, stránky 715-727. doi: 10.2353/ajpath.2007.070166.
- [42]. **DENK, Stephanie et al.** Complement C5a-Induced Changes in Neutrophil Morphology During Inflammation. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2017, Sv. 86, 3. doi: 10.1111/sji.12580.
- [43]. **FERENČÍK, M. et al.** *Imunitní systém - informace pro každého*. 1. vydání. Praha : Grada Publishing, a.s., 2005. str. str. 74. ISBN: 80-247-1196-6.
- [44]. **SEGAL, W., Anthony.** How Neutrophils Kill Microbes. *Annu Rev Immunol*. 2005, Sv. 23, stránky 197-223. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653.
- [45]. **WAHL, M. Larry et al.** Collagenase Production by Endotoxin-Activated Macrophages. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1974, Sv. 71, 9, stránky 3598-3601. doi: 10.1073/pnas.71.9.3598.
- [46]. **TROJAN, Stanislav.** *Lékařská fyziologie*. 4. vydání. Praha : GRADA Publishing, 2003. str. 150. ISBN: 80-247-0512-5.

- [47]. **REINKE, J.M., H. SORG.** Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res.* 2012, Sv. 49, stránky 35-43. doi: 10.1159/000339613.
- [48]. **GORDILLO, M. Gayle, Chandan S. SEN.** Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. *The American Journal of Surgery.* 2003, Sv. 186, 3, stránky 259-263. doi: 10.1016/S0002-9610(03)00211-3.
- [49]. **CLEMENS, Mark et al.** External fixators as an adjunct to wound healing. *Foot and Ankle Clinics.* 13, 2008, stránky 145-156. doi: 10.1016/j.fcl.2007.12.001.
- [50]. **MANNA, Biagio, Philipp NAHIRNIAK, Christopher A. MORRISON.** Wound Debridement. *StatPearls.* 2021. dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507882/>.
- [51]. **KUMAR, Vinay, Abul. K. ABBAS, Jon C. ASTER.** *Basic pathology.* Philadelphia : Elsevier, 2018. str. 36. ISBN: 978-0-323-35317-5.
- [52]. **LAMMERS, Richard.** Soft tissue foreign bodies. *Annals of Emergency Medicine.* 17, 1988, Sv. 12, stránky 1336-1347. doi: 10.1016/S0196-0644(88)80361-5.
- [53]. **BISSWANGER, Hans.** Enzyme assays. 1, 2014, Sv. 1-6, stránky 41-55. doi: 10.1016/j.pisc.2014.02.005.
- [54]. **RAHIM, Kashif et al.** Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microbial Ecology.* 73, 2017, stránky 710-721. doi: 10.1007/s00248-016-0867-9.
- [55]. **STAŇKOVÁ, Marta.** *Základy teorie ošetrovatelství.* Praha : Ústav teorie a praxe ošetrovatelství, 1. LF UK, 1996. ISBN 80-7184-243-5.
- [56]. **DAVIS, Kepler et al.** Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Nares Colonization at Hospital Admission and Its Effect on Subsequent MRSA Infection. *Clinical Infectious Diseases.* 39, 2004, stránky 776-782. doi: 1058-4838/2004/3906-0004.
- [57]. **GLADWIN, Mark, William TRATTLER, C. Scott MAHAN.** *Clinical microbiology made ridiculously simple.* 6. Miami : MedMaster, Inc., 2014. SBN #978-1-935660-15-6.
- [58]. **TANDARA, A. Andrea, Thomas A. MUSTOE.** Oxygen in Wound Healing—More than a Nutrient. *World Journal of Surgery.* 28, 2004, stránky 294-300. doi: 10.1007/s00268-003-7400-2.

- [59]. **MARTIN, A., Elisabeth, et. al.** *Concise Medical Dictionary*. 6. místo neznámé : Oxford University Press, 2003. ISBN: 198606001.
- [60]. **PICONI, Ludovica et al.** Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes Metab Res Rev*. 22, 2006, Sv. 3, stránky 198-203. DOI: 10.1002/dmrr.613.
- [61]. **MIRZA, Rita, Timothy J. KOH.** Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. *Cytokine*. 56, 2011, Sv. 2. doi: 10.1016/j.cyto.2011.06.016.
- [62]. **DURICA-TITIC, Svetlana, Yvonne GÖPEL, Boris, GÖRKE.** Carbohydrate Utilization in Bacteria: Making the Most Out of Sugars with the Help of Small Regulatory RNAs. *Microbiology Spectrum*. 6, 2018. doi:10.1128/microbiolspec.RWR-0013-2017.
- [63]. **POSPÍŠILOVÁ, Alena.** Bércový vřed. *Dermatologie v praxi*. 2, 2008, Sv. 2, stránky 79-84. dostupné z: <http://solen.cz/pdfs/der/2008/02/08.pdf>.
- [64]. **GOSAIN, Ankush, Luisa A. DIPIETRO.** Aging and Wound Healing. *World J. Surg*. 28, 2004, stránky 321-326. doi: 10.1007/s00268-003-7397-6.
- [65]. **FISHER, Gary, J. et al.** Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light. *N Engl J Med*. 337, 1997, stránky 1419-1429. DOI: 10.1056/NEJM199711133372003.
- [66]. **BROWN, L. Katherine, Tania J. PHILLIPS.** Nutrition and wound healing. *Clinics in Dermatology*. 28, 2010, Sv. 4, stránky 432-439. doi: 10.1016/j.clindermatol.2010.03.028.
- [67]. **HOKYNKOVÁ, A. et al.** Změny v kvalitě hojení ran po podání nenasycených mastných kyselin u potkana. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 81, 2018, stránky 29-31. doi: 10.14735/amcsnn2018S29.
- [68]. **COULTON, L., A.** Temporal relationship between glucose 6-phosphate dehydrogenase activity and DNA-synthesis. *Histochemistry*. 50, 1977, stránky 207-215. doi: 10.1007/BF00491068.
- [69]. **LIN, Pei-Hui et al.** Zinc in Wound Healing Modulation. 10, 2018, Sv. 1, 16. doi: 10.3390/nu10010016.

- [70]. **ULRICH-MERZENICH, Gudrun et al.** Vitamin C promotes human endothelial cell growth via the ERK-signaling pathway. *European journal of nutrition*. 46, 2007, Sv. 2, stránky 87-94. doi: 10.1007/s00394-006-0636-5.
- [71]. **POLCZ, Monica, Adrian BARBUL.** The Role of Vitamin A in Wound Healing. *Nutrition in clinical practice*. 34, 2019, Sv. 5, stránky 695-700. doi: 10.1002/ncp.10376.
- [72]. **SILVERSTEIN, Paul.** Smoking and Wound Healing. *The American journal of medicine*. 15, 1992, Sv. 93, 1A, stránky 22-24. doi: 10.1016/0002-9343(92)90623-j.
- [73]. **PRESTON, Alan et al.** Influence of environmental tobacco smoke on vitamin C status in children. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1, 2003, stránky 167-172. doi: 10.1093/ajcn/77.1.167.
- [74]. **COLE-KING, Alys, Keith Gordon HARDING.** Psychological Factors and Delayed Healing in Chronic Wounds. *Psychosomatic Medicine*. 63, 2001, Sv. 2, stránky 216-220.
- [75]. **BROADBENT, Elizabeth, Heidi KOSCHWANEZ.** The psychology of wound healing. *Current Opinion in Psychiatry*. 25, 2012, Sv. 2, stránky 135-140. doi: 10.1097/YCO.0b013e32834e1424.
- [76]. **YAO, Kaihan, Lily BAE, Wei Ping YEW.** Post-operative wound management. *Australian Family Physician*. 42, 2013, Sv. 12, stránky 867-870. ISSN:0300-8495.
- [77]. **RIOU, Jean-Pierre, Jon COHEN, Houston JOHNSON.** Factors influencing wound dehiscence. 163, 1992, Sv. 3, stránky 324-330. doi: 10.1016/0002-9610(92)90014-I.
- [78]. **SERSHON, Robert et al.** The Impact of an Acute, Traumatic Wound Dehiscence on Clinical. *The Journal of Arthroplasty*. 33, 2018, Sv. 8, stránky 2613-2615. doi: 10.1016/j.arth.2018.02.090.
- [79]. **BITTERMAN, Wilhelm, Mordechai GEMER, Edmund LUTWAK.** Wound Dehiscence Increased Intra-abdominal Pressure After Repair of Diaphragmatic Hernia. *Arch Surg*. 94, 1967, Sv. 2, stránky 178-180. doi: 10.1001/archsurg.1967.01330080016005.
- [80]. **LAWRENCE, Peter.** *General Surgery and Surgical Specialties*. 6. Philadelphia : Wolter Kluwer, 2019. eISBN: 9781496351050.



- [81]. GAUGLITZ, Gerd et al. Hypertrophic Scarring and Keloids: Pathomechanisms and Current and Emerging Treatment Strategies. *Molecular Medicine*. 17, 2011, Sv. 1-2, stránky 113-125. 10.2119/molmed.2009.00153.
- [82]. VAN DEN VEER, Willem, M. et al. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar. *Burns*. 35, 2009, stránky 15-29. doi: 10.1016/j.burns.2008.06.020.
- [83]. PROSKURYAKOV, Sergey, Anatoli G. KONOPLYANNIKOV, Vladimir L. GABAI. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research*. 283, 2003, Sv. 1, stránky 1-16. doi: 10.1016/S0014-4827(02)00027-7.
- [84]. VITIN, Alexander. *Gangrene Management*. Rijeka : InTech, 2013. doi: 10.5772/45961.
- [85]. STEJSKAL, Josef. *Obecná patologie v poznámkách*. 2. vydání. Praha : Nakladatelství H & H Vyšehradská, s.r.o., 2001. ISBN 80-86022-86-2.
- [86]. SHUKLA, Kumanr Sandeep. Pharmacological control of inflammation in wound healing. *Journal of Tissue Viability*. 28, 2019, Sv. 4, stránky 218-222. doi: 10.1016/j.jtv.2019.09.002.
- [87]. CAMPBELL, Abigail et al. Superficial Wound Closure Complications with Barbed Sutures Following Knee Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty*. 29, 2014, Sv. 5, stránky 966-969. doi: 10.1016/j.arth.2013.09.045.
- [88]. ASANO, Eisuke. A case of Schloffer tumor with rapid growth and FDG-PET positivity at the port site of laparoscopic sigmoidectomy for colon cancer. *Surgical Case Reports*. 116, 2019. doi: 10.1186/s40792-019-0677-7.
- [89]. Kumar, VINAY et al. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 9. Philadelphia : Elsevier, 2015. ISBN: 978-1-4557-2613-4.
- [90]. POSPÍŠILOVÁ, Alena. Léčba chronických ran moderními krycími prostředky. *Praktické lékařství*. 6, 2010, Sv. 6, stránky 276-281.
- [91]. HONG, Chiet Choon et al. Hydrosurgery is Effective for Debridement of Diabetic Foot Wounds. 43, 2014, Sv. 8, stránky 395-399. PMID: 25244988.
- [92]. VACHRAJANI, Vibhakar, Payal KHAKHKAR. *Science of Wound Healing and Dressing Materials*. Singapore : Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2020. doi: 10.1007/978-981-32-9236-9. ISBN: 978-981-32-9236-9.

- [93]. **RAMUNDO, Janet, Mikel GRAY.** Enzymatic wound debridement. *Journal of wound, ostomy and continence nursing.* 35, 2008, Sv. 3, stránky 273-280. doi: 10.1097/01.WON.0000319125.21854.78.
- [94]. **BAZALIŃSKI, Dariusz et al.** Effectiveness of Chronic Wound Debridement with the Use of Larvae of *Lucilia Sericata*. *Journal of Clinical Medicine.* 8, 2019, Sv. 11. doi: 10.3390/jcm8111845.
- [95]. **PECIVOVA, Jana et al.** Effect of the extract from salivary glands of *Lucilia sericata* on human neutrophils. *Neuro endocrinology letters.* 29, 2008, Sv. 5, stránky 794-797. PMID: 18987603.
- [96]. **JONES, Vanessa.** The use of gauze: will it ever change? *Internal Wound Journal.* 3, 2006, Sv. 2, stránky 79-86. doi: 10.1111/j.1742-4801.2006.00215.x.
- [97]. **GOUDA, Mohamed.** Nano-zirconium oxide and nano-silver oxide/cotton gauze fabrics for antimicrobial and wound healing acceleration. *Journal of Industrial Textiles.* 4, 2011, Sv. 3, stránky 222-240. doi: 10.1177/1528083711414960.
- [98]. **BOATENG, Joshua et al.** Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 97, 2007, Sv. 8, stránky 2892-2923. doi: 10.1002/jps.21210.
- [99]. **OUSEY, K. et al.** The importance of hydration in the wound healing: reinvigorating the clinical perspective. *Journal of wound care.* 25, 2016, Sv. 3.
- [100]. **BARANOSKI, Sharon, Elizabeth A. Ayello.** *Wound Care Essentials: Practice Principles.* 4. Philadelphia : Waters Kluwer, 2016. ISBN: 978-1-4698-8913-9.
- [101]. **PEPPAS, N.A. et al.** Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 50, 2000, stránky 27-46. doi: 10.1016/S0939-6411(00)00090-4.
- [102]. **MUCHOVÁ, Monika et al.** Design of dialdehyde cellulose crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for transdermal drug delivery and wound dressings. *Materials Science & Engineering.* 116, 2020. doi: 10.1016/j.msec.2020.111242.
- [103]. **LEI, Huan, Daidi FAN.** Conductive, adaptive, multifunctional hydrogel combined with electrical stimulation for deep wound repair. *Chemical Engineering Journal.* 424, 2021, Sv. 1. doi: 10.1016/j.cej.2021.129578.

- [104]. **CALÓ, Enrica, Vitaliy V. KHUTORYANSKIY.** Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*. 65, 2015, stránky 252-267. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024.
- [105]. **CHENG, Hao et al.** Sprayable hydrogel dressing accelerates wound healing with combined reactive oxygen species-scavenging and antibacterial abilities. *Acta Biomaterialia*. 124, 2021, stránky 219-232. doi: 10.1016/j.actbio.2021.02.002.
- [106]. **PÁČ, Libor, Milan DOKLÁDAL.** *Anatomie člověka II. Splanchnologie a cévní systé.* Brno : Ústřední knihovna lékařské fakulty, 2003.
- [107]. **CHOUCAIR, Michelle, Tania J. PHILLIPS.** Compression Therapy. *Dermatologic surgery*. 24, 1998, Sv. 1, stránky 141-148. doi: 10.1111/j.1524-4725.1998.tb04067.x.
- [108]. **SCHINTLER, M. V.** Negative pressure therapy: theory and practice. *Diabetes / Metabolism Research and Reviews*. 28, 2012, stránky 72-77. doi: : 10.1002/dmrr.2243.
- [109]. **ORYAN, Ahmad.** Potential Mechanisms and Application of Honeybee Products in Wound Management: Wound Healing by Apitherapy. *Burn, Infections and Wound Management*. 2, 2017, stránky 267-284. doi: 10.1007/15695\_2017\_38.
- [110]. **DENG, Qingzha et al.** PF-127 hydrogel plus sodium ascorbyl phosphate improves Wharton's jelly mesenchymal stem cell-mediated skin wound healing in mice. *Stem Cell Research & Therapy*. 11, 2020, Sv. 143. doi: 10.1186/s13287-020-01638-2.
- [111]. **CHEN, Li-You et al.** Effects of Rutin on Wound Healing in Hyperglycemic Rats. *Antioxidants*. 9, 2020, Sv. 1122. doi:10.3390/antiox9111122.
- [112]. **TRAN, Ngoc Quyen et al.** In Situ Forming and Rutin-Releasing Chitosan Hydrogels As Injectable Dressings for Dermal Wound Healing. *Macromolecules*. 12, 2011, stránky 2872-2880. doi:10.1021/bm200326g.
- [113]. **KIM, Ung-Jin, Masahisa WADA, Shigenori KUGA.** Solubilization of dialdehyde cellulose by hot water. *Carbohydrate Polymers*. 56, 2004, Sv. 1, stránky 7-10. doi: 10.1016/j.carbpol.2003.10.013.
- [114]. **LIANG, Chun-Chi, Ann Y PARK, Jun-Lin GUAN.** In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*. 2, 2007, stránky 329-333. doi: 10.1038/nprot.2007.30.

- [115]. **KUETE, V., O. KARAOSMANOĞLU, H. SIVAS.** Chapter 10 - Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*. 2017, stránky 271-297. doi: 10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8.
- [116]. **ENOCH, Stuart, David John LEAPER.** Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*. 2008, Sv. 26, 2, stránky 31-37. doi: 10.1016/j.mpsur.2007.11.005.
- [117]. **MATHAES, Roman et al.** Subcutaneous Injection Volume of Biopharmaceuticals-Pushing the Boundaries. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 105, 2016, 8, stránky 2255-2259. doi: 10.1016/j.xphs.2016.05.029.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

ABC	Význam první zkratky.
SC	Stratum corneum.
TEWL	Transepidermal water loss
NMF	Natural moisturizing factor
ECM	Extra cellular matrix
DIC	Diseminovaná intravaskulární koagulace
MDT	Maggot debridement therapy
TNP	Topical negative pressure
PVA	Poly(vinyl alcohol)
PAA	Poly(acrylic acid)
PVP	Poly(vinyl pyrrolidon)
PEG	Poly(ethylene glycol)
MRSA	Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
DAC	Dialdehydcelulózy
PBS	Phosphate buffer saline
EWC	Equilibrium water content
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
SAP	Sodium ascorbyl phosphate

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obrázek číslo 1 – zjednodušené schéma reakce –CHO skupiny DAC s hydroxylovou skupinou PVA v kyselém prostředí [102].....</i>	<i>45</i>
<i>Obrázek 2 – redukce MTT na formazan [115].....</i>	<i>49</i>
<i>Obrázek 3 – Mikrofotografie ze scratch testu simulujícího hojení ran.....</i>	<i>54</i>

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tabulka 1 - Přehled vzorků PVA/DAC.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabulka 2 – Přehled extrakčních poměrů vzhledem k použitému materiálu.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabulka 3 – přehled životaschopnosti buněk s odpovídajícím stupněm cytotoxicity dle ISO 10993.....</i>	<i>51</i>